

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Katarina Zmaić**

**UTJECAJ DODATKA RAZLIČITIH MODIFICIRANIH ŠKROBOVA NA  
TERMOFIZIKALNA SVOJSTVA PILEĆEG SURIMIJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, veljača 2019.**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za prehrambene tehnologije  
Katedra za tehnologiju mesa i ribe  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Tehnologija mesa i ribe

**Tema rada** je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 28. rujna 2018.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Krešimir Mastanjević*

**Pomoć pri izradi:**

**Utjecaj dodatka različitih modificiranih škrobova na termofizikalna svojstva pilećeg surimija**

*Katarina Zmaić*

**Sažetak:**

Diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom (DSC) određen je utjecaj modificiranih škrobova na termofizikalna svojstva pilećeg surimija. Uzorci pilećeg surimija pomiješani su s modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke 1 (MTS1) ( $w = 5$  i  $10\%$ ), modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke 2 (MTS2) ( $w = 5$  i  $10\%$ ) i modificiranim škrobom izoliranim iz ječma (MBS =  $5$  i  $10\%$ ). Izmjerene su temperature početka denaturacije ( $T_0$ ), temperature denaturacije ( $T_p$ ), temperature završetka denaturacije ( $T_e$ ) te entalpije denaturacije ( $\Delta H$ ). Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DMK) pokazala je pomak temperatura denaturacije ( $T_p$ ) miozina i aktina na više vrijednosti u uzorcima pomiješanim s MBS te na niže temperature u uzorcima pomiješanim s MTS1 i MTS2. Entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina pilećeg surimija pokazala je povećanje s porastom masenog udjela MBS, odnosno smanjenje s porastom masenog udjela MTS1 i MTS2. Povišenje temperature denaturacije i entalpije u uzorcima upućuje na moguće interakcije između miofibrilarnih proteina i modificiranog škroba izoliranog iz ječma.

**Ključne riječi:** temperatura denaturacije, entalpija denaturacije, DMK, modificirani škrob, miofibrilarni proteini

**Rad sadrži:** 54 stranica  
18 slika  
5 tablica  
0 priloga  
32 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Juroslav Babić</i>            | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Krešimir Mastanjević</i> | član-mentor   |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Marko Jukić</i>          | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 21. veljače 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food technologies  
Subdepartment of Technology of Meat and Fish  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technology of Meat and Fish

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI. held on September 28, 2018.

**Mentor:** *Krešimir Mastanjević, PhD, associate profesor*

**Technical assistance:**

### Effect of various modified starches on the thermophysical properties of chicken surimi

*Katarina Zmaić*

### Summary:

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to determine influence of modified starches on thermophysical properties of myofibrillar protein concentrate (MPC). Samples of chicken surimi were mixed with tapioca modified starch (MTS1) ( $w = 5$  and  $10\%$ ), tapioca modified starch (MTS2) ( $w = 5$  and  $10\%$ ) and barley modified starch (MBS) ( $w = 5$  and  $10\%$ ). Onset temperature of transition ( $T_o$ ), peak thermal transition ( $T_p$ ), endset temperature of transition ( $T_e$ ), and denaturation enthalpy ( $\Delta H$ ) were evaluated. Differential scanning calorimetry (DSC) revealed a shift in peak thermal transition temperature ( $T_p$ ) of myosin and actin to higher temperature in samples mixed MBS and to the lower temperatures in samples mixed with MTS1 and MTS2. Transition enthalpies for myofibrillar proteins showed increase with incense of mass fraction of MBS and decrease with the increase of mass fractions of MTS1 and MTS2. Increase of transitions temperatures and enthalpies in samples indicates possible interactions between myofibrillar proteins and modified barley starch (MBS).

**Key words:** thermal transitions temperature, transitions enthalpy, DSC, modified starch, myofibrillar proteins

**Thesis contains:** 54 pages  
18 figures  
5 tables  
0 supplements  
32 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Juroslav Babić</i> , PhD, full prof.             | chair person |
| 2. <i>Krešimir Mastanjević</i> , PhD, associate prof.  | supervisor   |
| 3. <i>Marko Jukić</i> , PhD, associate prof.           | member       |
| 4. <i>Daliborka Koceva Komljenić</i> , PhD, full prof. | stand-in     |

**Defense date:** Thursday 21, 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Krešimiru Mastanjević na uloženom trudu i vremenu da prenese svoje znanje i pomoći oko izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim profesorima koji su uložili veliki trud da od nas naprave stručnjake, nadam se da ću opravdati njihovo povjerenje.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem obitelji i dečku na pruženoj podršci, vjeri u mene i moj rad tijekom studija.*

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1. ŠKROB.....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1.1. Modificirani škrobovi .....  | 5         |
| 2.1.2. Primjena modificiranih škrobova u mesnoj industriji.....                             | 7         |
| <b>2.2. KONZERVIRANJE MESA ZAMRZAVANJEM .....</b>   | <b>8</b>  |
| 2.2.1. Mehanizam tvorbe leda .....  | 9         |
| 2.2.2. Veličina kristala leda i utjecaj na kvalitetu .....                                  | 9         |
| 2.2.3. Krioprotektori .....   | 10        |
| <b>2.3. MIOFIBRILARNI PROTEINI .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.4. PILEĆI SURIMI.....</b>  | <b>12</b> |
| 2.4.1. Tehnologija proizvodnje surimija .....   | 12        |
| 2.4.2. Tehnologija proizvodnje pilećeg surimija .....                                       | 14        |
| <b>2.5. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DMK).....</b>                              | <b>15</b> |
| 2.5.1. DMK toplinskog toka.....   | 17        |
| 2.5.2. DMK kompenziranog toplinskog toka .....  | 18        |
| 2.5.3. Primjena DMK u analizi proteina .....  | 19        |
| 2.5.4. Primjena DMK za određivanje krioprotektorske djelotvornosti zamrznute hrane<br>..... | 20        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3.1. ZADATAK .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.2.1. Modifikacija izoliranog škroba iz ječma (MBS) i tapioke (MTS1 i MTS2) .....          | 22        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.2.    | Priprema uzoraka pilećeg mesa .....  | 23        |
| 3.2.3.    | Određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina<br>uzoraka pilećeg surimija ..... | 26        |
| 3.2.4.    | Određivanje pH vrijednosti i osnovnog kemijskog sastava .....  | 29        |
| 3.2.5.    | Određivanje aktiviteta vode ( $a_w$ ).....   | 30        |
| 3.2.6.    | Statistička obrada rezultata .....   | 31        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>   | <b>33</b> |
| 4.1.      | REZULTATI.....   | 34        |
| 4.2.      | RASPRAVA.....  | 44        |
| <b>5.</b> | <b>ZAKLJUČCI .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURA .....</b>  | <b>51</b> |

## Popis oznaka, kratica i simbola

|            |   |
|------------|---|
| $a_w$      | <i>aktivitet vode</i>                             |
| ASTM       | <i>American Society for Testing and Materials</i> |
| BMV        | <i>blijedo, meko, vodnjikavo meso</i>             |
| DMK        | <i>diferencijalna motridbena kalorimetrija</i>    |
| SpVV       | <i>sposobnost vezanja vode</i>                    |
| $T_e$      | <i>završna temperatura denaturacije</i>           |
| $T_o$      | <i>početna temperatura denaturacije</i>           |
| $T_p$      | <i>temperatura denaturacije</i>                   |
| $w$        | <i>maseni udio</i>                                |
| $\Delta H$ | <i>entalpija denaturacije</i>                     |

## **1. UVOD**



Zamrzavanje je danas u svijetu jedna od najčešćih metoda konzerviranja hrane kojom se gotovo na neodređeno vrijeme, može održati mikrobiološka i biokemijska stabilnost hrane. Zamrzavanje uzrokuje određene više ili manje ireverzibilne promjene u hrani, koje su izravna ili neizravna posljedica tvorbe leda i u funkciji su brzine zamrzavanja, što je zamrzavanje brže to su te promjene manje i obrnuto.

Jedna od najznačajnijih promjena je denaturacija miofibrilarnih proteina mesa zamrzavanjem i skladištenjem u smrznutom stanju, do kojih dolazi nakon gubitka vode iz staničnih struktura koja je do tada služila kao svojevrsna mehanička barijera između proteinskih lanaca.

Pileći surimi, proizveden modificiranom tehnologijom proizvodnje preuzetom iz proizvodnje ribljeg surimija, ima dobra tehnološka svojstva poput visoke sposobnosti vezanja vode i stvaranja jakih gelova nakon zagrijavanja. Kako bi se tehnološka svojstva dodatno poboljšala, dodaju se razni dodaci kao npr. škrob i/ili albumin iz jajeta. Škrob se dodaje radi poboljšanja svojstava želatinizacije i teksture (Belibagi I sur., 2003.). Želatinizacija škroba popraćena je povećanjem viskoznosti, bubrenjem granula, otapanjem kristala te gubitkom birefringencije (Cheow i Yu, 1997.).

Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DMK) je korisna tehnika za analizu ponašanja mišićnih proteina u različitim toplinskim uvjetima (Findlay I Barbut, 1990.). Promjene u strukturi proteina tijekom DMK analize nazivaju se prijelazne temperature, a maksimalne temperature pri tim prijelazima koriste se njihovo prikazivanje.

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj modificiranih škrobova izoliranih iz tapioke (MTS1 i MTS2) te modificiranog škroba izoliranog iz ječma (MBS) na termofizikalna svojstva pilećeg surimija (MPC) pomoću diferencijalne motridbene kalorimetrije (DMK).

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ŠKROB

Škrob je polisaharid, polimer glukoze koji se u prirodi javlja u obliku škrobnih zrnaca (granula). Izgrađen je od jedinica glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6 glikozidnim vezama u dva polimerna lanca; amilozu i amilopektin. Amiloza i amilopektin čine 98–99 % suhe tvari škroba (Babić i sur., 2013.).

Amiloza je gotovo ravnolančasti polimer izgrađen od jedinica  $\alpha$ -D-glukoze međusobno povezane  $\alpha$ -1,4 glikozidnim vezama. Mjesta grananja su vrlo rijetka tako da amiloza zadržava svojstva ravnolančastog polimera i uvija se u strukturu dvostruke uzvojnice (Šubarić i sur., 2012.). Molekule amiloze imaju hidrofobnu (lipofilnu) unutrašnjost što im omogućuje formiranje kompleksa s jodom. Jod (kao  $I_3^-$ ) stvara komplekse s amilozom i amilopektinom. Amiloza-jod kompleks je plave boje što se koristi za određivanje škroba i količine amiloze u škrobu (Walter, 1998.).

Amilopektin je razgranati polimer sastavljen od glukoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4 glikozidnim vezama u strukturu ravnog lanca te  $\alpha$ -1,6 vezama na mjestima grananja (Van Beyrun i Roles, 2005.).

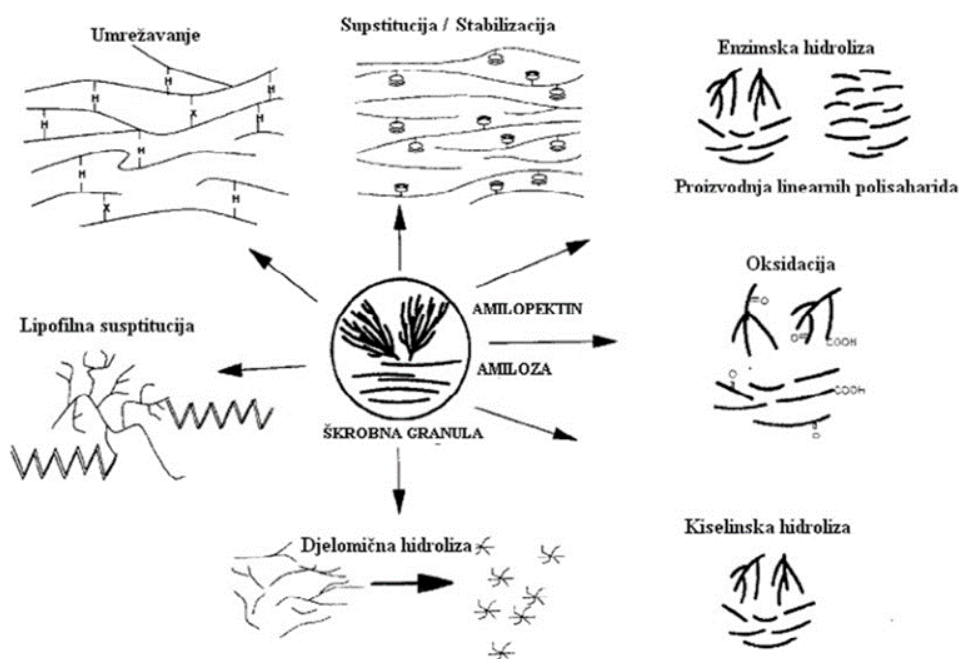
Škrob je produkt asimilacije u lišću zelenih biljaka. Osnovne sirovine iz kojih se proizvodi škrob su: kukuruz, krumpir, tapioka, pšenica i riža (Šubarić i sur., 2011.). Veličina i oblik škrobnih zrnaca te udio amiloze i amilopektina ovisi o botaničkom podrijetlu škroba (Jobling, 2004.). Zbog jedinstvenih kemijskih i fizikalnih svojstava te nutritivne vrijednosti, ima raznu primjenu u prehrambenoj industriji. Koristi se kao emulgator, sredstvo za povezivanje različitih sastojaka, stvaranje filma, stabilizaciju pjene, vezanje vode i arome, kao zamjenske masti, sredstva za postizanje određene teksture, poboljšanje stabilnosti i teksture i dr. (Eliason, 2004.).

Ponašanja škrobnih granula u vodenoj suspenziji ovisi o gustoći granule, strukturi amiloze i amilopektina, kristalnoj strukturi granule te omjeru amiloze i amilopektina. Škrob je netopljiv u hladnoj vodi, ali može reverzibilno apsorbirati određenu količinu vode pri čemu dolazi do bubrenja škrobne granule. Većinom se mora otopiti prilikom industrijske primjene. Otapanje škroba u vodi naziva se želatinizacija. Provodi se zagrijavanjem škrobne suspenzije u vodi pri čemu nastaju razne ireverzibilne promjene; otapanje granule, nastajanje gela, povećanje viskoznosti, gubitka optičke aktivnosti, narušavanja kristalnog uređenja granule i dr.

Hlađenjem želatinizirane škrobne paste dolazi do povezivanja otopljenih molekula škroba vodikovim vezama. Sustav škrob/voda prelazi u stanje s manjim sadržajem energije. Ovo svojstvo se naziva retrogradacija škroba (Babić i sur., 2013; Šubarić i sur., 2011.).

### 2.1.1. Modificirani škrobovi

Modificiranim škrobovima se smatraju škrobovi kojima je izmijenjena fizikalna i/ili kemijska struktura nekih D-glukoznih jedinica u molekuli. Modificiranjem različitim kemijskim, fizikalnim ili enzimskim postupcima te kombinacijom navedenih postupaka (**Slika 1**) žele se poboljšati ili postići određena specifična funkcionalna svojstva škroba (Babić i sur., 2013; Šubarić i sur., 2011.). Neka od njih su: sniženje/povišenje temperature želatinizacije pri čemu nastaje škrob topljiv u hladnoj vodi, povećanje/sniženje viskoznosti škrobne paste, povećanje stabilnosti te postizanje drugih specifičnih svojstava kao što su otpornost na procese smrzavanja/odmrzavanja, prozirnost paste, otpornost na sniženi pH, visoke temperature, i dr. Osnovne sirovine za proizvodnju komercijalnih modificiranih škrobova su kukuruz, voštani kukuruz, tapioka i krumpir. Najčešći kemijski postupci modifikacije škroba uključuju esterifikaciju, eterifikaciju, oksidaciju i umrežavanje (Babić, 2011.).



**Slika 1** Postupci modificiranja škroba (Šubarić i sur., 2011.)

Supstitucijom hidroksilne skupine sa funkcionalnom (esterskom ili eterskom) nastaju škrobni esteri ili eteri. Funkcionalne skupine mogu biti acetatna, fosfatna, hidroksipropilna, i dr.).

Stupnjem supstitucije (DS) se pokazuje koliko je zamijenjenih hidroksilnih skupina unutar škroba. Škrobni eteri su stabilniji od škrobnih estera, čak i u uvjetima visokih pH vrijednosti (Šubarić i sur., 2012.).

Škrobni acetati zauzimaju najveći udio u proizvodnji supstituiranih modificiranih škrobova zbog jednostavnosti procesa proizvodnje i jeftinog reagensa. Najčešće korišteni reagensi su octena kiselina, acetanhidrid, vinil acetat, N-acetil imidazol i acetil fosfat. Uglavnom se koristi acetanhidrid, sam ili u kombinaciji s katalizatorima. Za ubrzanje proizvodnje koriste se sljedeći katalizatori: NaOH, sumporna kiselina, piridin te vodikov peroksid sa solima željeza. Kao krajnji produkt dobivaju se škrobovi koji zadržavaju stabilnu strukturu i teksturu proizvoda pri oscilaciji temperature, s nižom temperaturom želatinizacije, smanjenom tendencijom retrogradacije i sinereze škrobnih pasta i gelova. Međutim, škrobni acetati imaju manju stabilnost u kiselim uvjetima i tijekom miješanja pri visokim temperaturama (Babić i sur., 2009; Šubarić i sur., 2011.). Primjenom kombinacije esterifikacije škroba s umrežavanjem, dobivaju se bolja svojstva modificiranog škroba (Šubarić i sur., 2011.).

Tretiranjem škroba multifunkcionalnim reagensima dolazi do njegova umrežavanja. Stvaraju se intra- i intermolekulske veze između molekula škroba što dovodi do značajnog povećanja prosječne molekulske mase škroba i stvaranja stabilne kovalentne veze. Za umrežavanje škrobova najčešće se koriste fosfor oksiklorid, natrij tripolifosfat (STPP), natrij trimonofosfat (STMP), epiklorhidrin, smjesa adipinske kiseline i acetanhidrida te vinil-klorid. Svojstva umreženih škrobova su: viša temperatura želatinizacije, niži kapacitet bubrenja, otpornost na visoke temperature, mehaničku degradaciju, kemijske reakcije i snižen pH. Zbog toga se upotrebljavaju kada je potrebna stabilna, visoko viskozna pasta pri visokoj temperaturi ili niskom pH (Babić, 2007.; Gunaratne, 2006.).

Kao reagens za oksidaciju škroba najčešće se koriste hipokloriti, koji prevode hidroksilne u karboksilne i karbonilne skupine. Oksidacijom se depolimerizira molekula što rezultira manje viskoznim pastama i gelovima te škrobovima otpornijim na retrogradaciju (Babić, 2007.; Šubarić i sur., 2011.). Oksidirani škrob je bjelji od nativnog jer se procesom oksidacije uklanjaju pigmenti te 70-80 % nečistoća koje sadrže dušik. Međutim, oksidirani škrobovi su osjetljiviji na povišenu temperaturu pri kojoj mijenjaju boju u nepoželjnu žutu ili smeđu. Svojstva kojima odlikuje oksidirani škrob su niža temperatura želatinizacije, snižena tendencija retrogradacije te dobivanje prozirnih pasti (Babić, 2007.).

### 2.1.2. Primjena modificiranih škrobova u mesnoj industriji

Dodaci na bazi škroba koriste se u mesnoj industriji sami ili s drugim dodacima, najčešće hidrokoloidima. Svrha dodataka je vezanje vode, emulgacija, poboljšanje iskorištenja, stabilnosti i teksture mesnih proizvoda, te se koriste kao zamjenske masti i pri razvoju novih proizvoda (Babić i sur., 2013.). U **tablici 1** prikazana je primjena pojedinih skupina modificiranih škrobova u mesnoj industriji (Tarté, 2009.).

**Tablica 1** Primjena pojedinih skupina modificiranih škrobova u mesnoj industriji (Tarté, 2009.)

| <i>Tip modifikacije</i> | <i>Svrha modificiranja</i> | <i>Funkcionalno svojstvo za mesnu industriju</i>   |
|-------------------------|----------------------------|--|
| <i>Supstitucija</i>     | Poboljšanje topljivosti    | Sniženje temperature želatinizacije<br>Poboljšanje stabilnosti na procese zamrzavanja/odmrzavanja te trajnosti proizvoda |
| <i>Umrežavanje</i>      | Stabilizacija              | Otpornost na visoke temperature te niži pH   |
| <i>Dekstrinizacija</i>  | Hidroliza                  | Niska viskoznost<br>Zamjenske masti<br>Poboljšanje topljivosti   |
| <i>Enzimi</i>           | Sniženje viskoznosti       | Niža viskoznost<br>Zamjenske masti   |
| <i>Oktenilsukcinat</i>  | Emulgiranje                | Stabiliziranje emulzija<br>Smanjenje gubitka masti   |

Supstituirani škrobovi, dobiveni tretiranjem škroba s propilenoksidom, upotrebljavaju se za poboljšanje stabilnosti mesnih prerađevina tijekom zamrzavanja i/ili odmrzavanja. Esterifikacijom škrobova poboljšava se sposobnost vezanja vode (SpVV), smanjuju se gubitci tijekom kuhanja, poboljšava se tekstura i produžuje trajnost mesnih proizvoda. Škrobovi tretirani okt-1-enilsukcinanhidridom imaju emulgirajuća svojstva te se dodaju u mesne proizvode radi stabilizacije i zadržavanja masti tijekom kuhanja. Dodatak supstituiranih škrobova (2 - 3 %) poželjan je ukoliko je sirovina lošije kvalitete ili kod proizvoda s visokim udjelom vode, npr. kod proizvodnje kobasica. Pri proizvodnji mesnih proizvoda s visokim udjelom masti, dodatak modificiranih škrobova osigurava poboljšanje stabilnosti gotovog proizvoda.

Umreženi škrobovi upotrebljavaju se kao sredstva za postizanje željene teksture i brže sterilizacije pri proizvodnji konzerviranih mesnih proizvoda. Visoko-amilozni modificirani škrobovi imaju primjenu u proizvodnji pohanih mesnih proizvoda. Koriste se kao dodaci

smjesama za prekrivanje njihove površine kako bi poboljšali teksturu i snizili apsorpciju ulja tijekom prženja, dok dodatak umreženih škrobova pospješuje hrskavost proizvoda.

Modificirani škrobovi imaju primjenu i kao zamjenske masti. Kod proizvodnje mesnih proizvoda smanjenog udjela masti koriste se modificirani škrobovi, hidrokoloidi i proteini. Njihovom kombinacijom dobiva se proizvod zadovoljavajuće teksture. Najčešće se koriste dekstrini koji ujedno imaju primjenu i kao dodaci različitim zaštitnim slojevima i smjesama za oblaganje mesnih proizvoda.

U proizvodnji surimi proizvoda škrobovi se prvenstveno dodaju radi ekonomičnosti što se postiže povećanjem udjela suhe tvari dodatkom škroba kao znatno jeftinije sirovine. Dodatkom modificiranih škrobova postiže se veća SpVV te poboljšanje teksture. Kao modificirani škrobovi najčešće se koriste modifikati voštanog kukuruznog škroba, tapioke i krumpira (Babić i sur., 2013.).

## 2.2. KONZERVIRANJE MESA ZAMRZAVANJEM

Fizikalna metoda konzerviranja hrane gdje se primjenom niskih temperatura stvaraju nepovoljni uvjeti za rast i razmnožavanje mikroorganizama naziva se zamrzavanje (Herrera i Mackie, 2004.). Dva su osnovna principa konzerviranja zamrzavanja: sniženje temperature hrane te kristalizacija i izdvajanje kemijski čiste vode. Pri svakom sniženju temperature hrane za 10 °C degradabilni procesi razgradnje hrane usporavaju dva do tri puta. Kristalizacijom se izdvaja kemijski čista voda, koncentrira intra- i ekstracelularna tekućina, smanjuje  $a_w$  hrane, snižava pH te inhibiraju enzimske reakcije i razvitak mikroorganizama. Temperature zamrzavanja dovode do reverzibilne anabioze mikroorganizama (Kovačević, 2001.; Mastanjević, 2010.).

Postupci zamrzavanja mesa mogu se podijeliti prema brzini zamrzavanja i načinu odvođenja topline. Prema brzini zamrzavanja dijele se na:

- spore, kod kojih je brzina kretanja fronte leda 0,1-0,2 cm/h,
- brze, kod kojih je brzina kretanja fronte leda 0,5-3,0 cm/h i
- vrlo brze, kod kojih je brzina kretanja fronte leda 5,0-10,0 cm/h i više (Lovrić, 2003.; Mastanjević, 2010.).

Optimalna brzina zamrzavanja mesa veća je od 0,5 cm/h.

Prema načinu odvođenja topline postupci zamrzavanja se dijele na:

- zamrzavanje u struji hladnog zraka,
- zamrzavanje kontaktom s hladnim površinama i
- zamrzavanje uranjanjem (imerzijom) u rashladno sredstvo (Mastanjević, 2010.).

### **2.2.1. Mehanizam tvorbe leda**

Kristalizacija vode odvija se u dvije faze: nukleacija i faza kristala leda. Nukleacija može biti homogena i heterogena. Homogena nukleacija je vrlo rijetka i nastaje slučajnom agregacijom vode visoke čistoće uz pothlađivanje od  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Heterogena nukleacija nastaje u realnim sustavima gdje su prisutne sitne krute čestice slične konfiguracije ledu, odnosno pri zamrzavanju hrane. Druga faza je rast kristala leda. Rast kristala započinje kada je stvoren nukleus kritične veličine. Na brzinu rasta utječu: brzina ugradnje molekula vode u kristale leda, brzina difuzije molekula vode iz nesmrznute otopine prema površini kristala, brzina odvođenja topline te temperatura (Lovrić, 2003.).

### **2.2.2. Veličina kristala leda i utjecaj na kvalitetu**

Veličina kristala je funkcija brzine zamrzavanja, odnosno brzine odvođenja topline. Značajno utječe na kvalitetu zamrznute hrane. Ovisi o broju molekula nastalih tijekom zamrzavanja. Ukoliko nastane manji broj nukleusa, nastat će manji broj većih kristala leda i obrnuto, što je veći broj jezgri, nastat će veći broj sitnijih kristala (Lovrić, 2003.).

Brzim zamrzavanjem mesa nastaje veliki broj nukleusa kristalizacije raspoređenih podjednako intra- i ekstracelularno. Prelaskom vode u led i nastanka razlike tlaka intra- i ekstracelularne tekućine, neznatna količina vode migrira izvan stanice, dok velika količina vode ostaje zadržana u staničnim strukturama. Služi kao mehanička barijera te tako sprječava koagulaciju proteinskih lanaca. Mali kristali leda uzrokuju manja mehanička oštećenja mišićnog tkiva u odnosu na velike. Više reflektiraju svjetlost od velikih zbog čega je smrznuto meso svijetlije od mesa zamrznutog sporom metodom. Intracelularnim rastom malih kristala leda voda minimalno migrira unutar stanice, što tijekom odmrzavanja dovodi do manjeg izlučivanja eksudata (mesnih sokova koji sadrže otopljene aminokiseline, mineralne soli, ekstraktivne tvari, itd.), odnosno manjeg kala odmrzavanja (Lovrić, 2003.; Mastanjević, 2010.).



Sporim zamrzavanjem nastaju veća oštećenja mišićnog tkiva, smanjena topljivost miofibrilarnih proteina i sposobnost vezanja vode. Povećava se kalo odmrzavanja. Sporim zamrzavanjem nastaje mali broj nukleusa rekristalizacije, i to uglavnom ekstracelularno. Izdvaja se kemijski čista voda u obliku kristala leda, koncentrira se ekstracelularna tekućina i povećava osmotski tlak zbog čega stanična tekućina difundira van stanice i doprinosi rastu ekstracelularnih kristala leda. Odmrzavanjem mesa dolazi do ireverzibilnog gubitka vode iz staničnih struktura, denaturacije (koagulacije) proteina te većeg izlučivanja eksudata (Mastanjević, 2010.).

Osim brzine zamrzavanja, drugi čimbenici također mogu imati utjecaj na veličinu kristala: vrsta mesa, anatomska građa mesa, fiziološko stanje, podrijetlo, uvjeti skladištenja, itd. Kako bi se smanjila strukturna oštećenja tijekom zamrzavanja mesa i skladištenja u zamrznutom stanju, u meso se dodaju krioprotektori (Lovrić, 2003.; Perez-Chabela i Mateo-Oyague, 2004.).

### 2.2.3. Krioprotektori

Sprečavanje denaturacije i očuvanje sposobnosti želiranja miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja vrši se dodavanjem različitih krioprotektora (MacDonald i Lanier, 1991.). Krioprotektori imaju ulogu posrednika pri vezanju vode za proteine i time povećavaju maseni udio vezane (nesmrzljive) vode. Vezana voda pri uobičajeno korištenim temperaturama zamrzavanja služi kao mehanička barijera između lanaca miofibrilarnih proteina i sprječava denaturaciju funkcionalnih proteina. Dio krioprotektorskih molekula se otapa zbog slične površinske napetosti onoj na granici vode i leda. Tada služi kao nukleus kristalizacije i doprinosi stvaranju velikog broja malih kristala leda (Herrera i Mackie, 2004.; Mastanjević, 2010.).

Krioprotektori djeluju preko funkcionalnih hidroksilnih i karboksilnih grupa koje stvaraju vodikove mostove s dipolnim molekulama vode i disociranim polarnim grupama aminokiselinskih ostataka. Kao rezultat sprečava se proces dehidracije proteina, intermolekularne reakcije „oslobođenih“ funkcionalnih skupina i stvaranje nepoželjnih sekundarnih produkata (koagulacija). Osim toga, usporena je ili potpuno obustavljena migracija vode iz okoline proteinskih molekula, smanjena je površinska napetost vode koja usporava rast i ograničava veličinu kristala leda, te je spriječeno prekomjerno koncentriranje otopine i povećanje aktiviteta otopljene tvari (MacDonald i Lanier, 1991.; Mastanjević, 2010.).

Tvari poput monosaharida, disaharida, šećernih alkohola i polisaharida pokazuju visoku krioprotektivnu ulogu. Ugljikohidrati se smatraju najznačajnijim krioprotektorima, ali zbog slatkastog okusa njihova je primjena ograničena (Herrera i Mackie, 2004.; Tornaniak i sur., 1998.). Najučinkovitijim inhibitorom denaturacije proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju pokazala se smjesa saharoze, sorbitola i natrijeva trifosfata (Kovačević, 2001.).

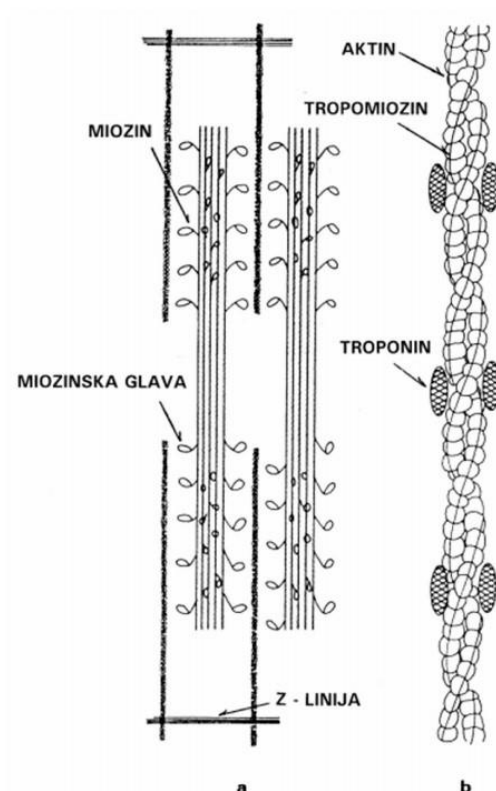
### 2.3. MIOFIBRILARNI PROTEINI

Mišićni proteini mogu se podijeliti u tri osnovne skupine:

- 1) miofibrilarni - proteini topljivi u otopinama soli,
- 2) sarkoplazmatski – proteini topljivi u vodi i slabim otopinama soli, te
- 3) vezivnotkivni ili proteini strome – proteini netopljivi u vodi i otopinama soli (Mastanjević, 2010.).

Miofibrilarni proteini čine oko 50-55 % ukupnog proteinskog sadržaja mišića (Tornberg, 2005.). Dijele se na miozin, aktin, tropomiozin, troponin,  $\alpha$ -aktinin,  $\beta$ -aktinin, "M-prtein" i "C-pretein". Najznačajniji su miozin i aktin (Kovačević, 2001.).

Miozin je fibrilarni protein  $\alpha$ -keratinskog tipa. Izgrađen je po principu  $\alpha$ -heliks uzvojnice (**Slika 2**). Sastoji se od dva polipeptidna lanca s oko 2000 aminokiselinskih ostataka. Svaka molekula miozina se sastoji od dvije identične jedinice koje se sastoje od glave, vrata i repa, odnosno glave i štapića. Na globularno spljoštenim glavama nalazi se aktivno središte za vezanje aktina s miozinom. Miozini se slažu jedan pored drugog u snopiće, pri čemu su glave miozina okrenute prema aktinu. U predjelu repa nalazi se veliki broj kiselih (asparaginska i glutaminska kiselina) i lužnatih (histidin, arginin i lizin) aminokiselinskih ostataka, što dovodi do velike sposobnosti vezanja vode na štapiće. Miozin nije samo strukturni protein, već ima i svojstva enzima za što je najodgovornija glava miozina (Kovačević, 2001.; Mastanjević, 2010.).



**Slika 2** Shematski prikaz građe miofilamenata (a - građa miofibrila, b - građa tankih filamenata) (Karlson, 1998.)

Aktin je "kontraktilni" protein miofibrila prisutan u mišićnom tkivu u količini od 11 do 17 %. Građen je od velikog broja globularnih monomera G-aktina povezanih u lance (Mastanjević, 2010.). Aktin sadrži puno prolina što uzrokuje klupčanje proteinskih lanaca u globule i onemogućavanje nastajanja helične strukture. Globule su sferične strukture s nepolarnim grupama okrenutim prema sredini globula i polarnim okrenutim prema površini. Zbog takve strukture, aktin ima malu SpVV. Pretpostavlja se da su pri formiranju aktinskog miofilamenta prisutni i tropomiozin, troponin i  $\alpha$ -aktinin. Njihova uloga je djelovanje kao osnova oko koje se formira aktinski miofilament (Slika 2), pri čemu određuju njegovu dužinu. Također se smatra da se ugrađuju u osnovu heliksa aktina, u žljebove između nizova G-aktina (Kovačević, 2001.; Rabelić, 1978.).

## 2.4. PILEĆI SURIMI

### 2.4.1. Tehnologija proizvodnje surimija

Surimi je poluproizvod proizveden strojnim iskoštavanjem i višestrukim ispiranjem ribljeg mesa solima ( $\text{NaCl}$  i  $\text{NaHCO}_3$ ) te dodatkom različitih krioprotektora. Dodatak krioprotektora

omogućuje sprječavanje denaturacije miofibrilarnih proteina i gubitak sposobnosti želiranja tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju. Prema biokemijskim značajkama, surimi je vlažni koncentrat miofibrilarnih proteina. Miofibrilarni proteini su izolirani iz iskoštenog ribljeg mesa postupkom usitnjavanja i višestrukog ispiranja (Kovačević, 2001.).

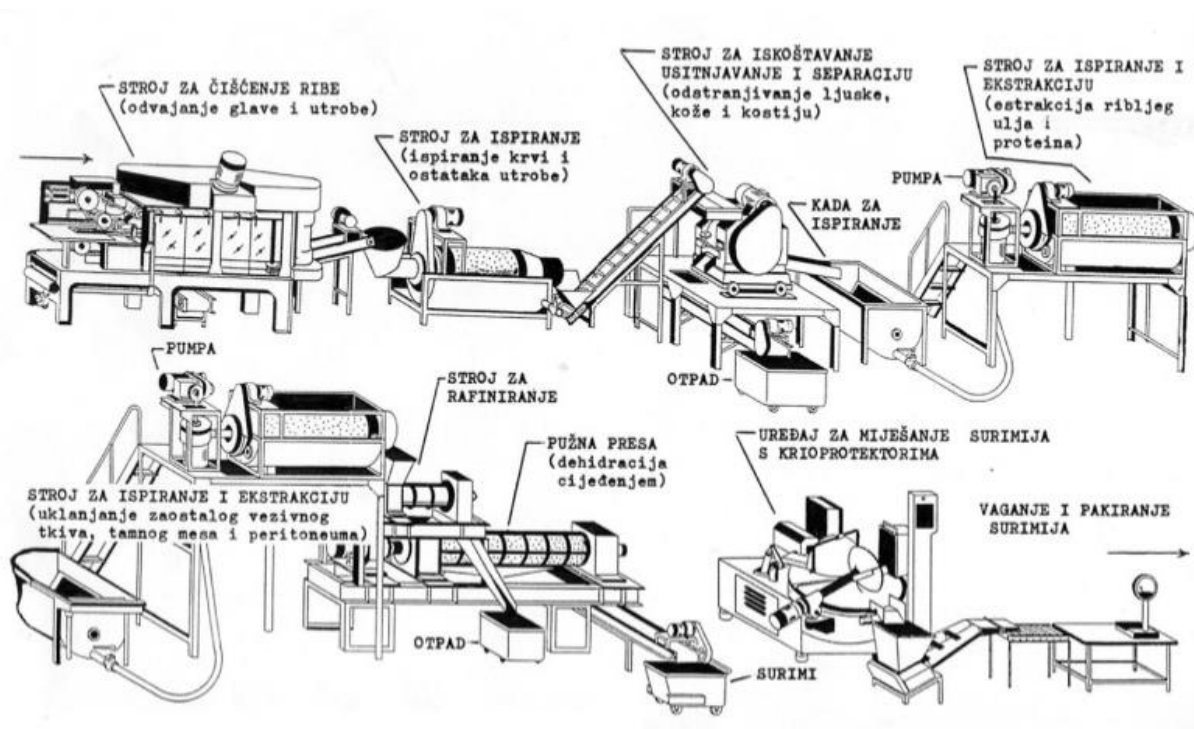
Najvažnija funkcionalna svojstva surimija su kapacitet želiranja i stabilnost tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju. Zbog veće zastupljenosti funkcionalnih (miofibrilarnih) proteina, gel surimija je cjelovitiji, homogeniji i elastičniji od gela životinja za klanje. Odlikuje se velikom gustoćom umreženih fibrila aktinomiozina, elastičnošću, ravnomjernom raspodjelom proteina i kompaktnošću strukture kao rezultat sastava, homogenizacije tijekom pripreme i krioprotektorskog djelovanja dodanih sastojaka. Proteine životinja za klanje u prosjeku čine 16-28% sarkoplazmatski, te podjednakim udjelom proteini strome koji ne sudjeluju u procesu želiranja ili imaju inhibirajući učinak. Ioni teških metala, osobito  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  koji s proteinima sarkoplazme grade helate nakon dezintegracije mišićnih vlakana, vežu se s disociranim karboksilnim grupama proteina. Tako sprječavaju interakcije proteinskih lanaca i inhibiraju proces želiranja (Kovačević, 2001.).

Surimi se najviše proizvodi iz Alaske ugotice (*Theragra Chalcogramma*). U Republici Hrvatskoj najznačajnija sirovina je srdela od koje se dobiva surimi kvalitete jednake super A klasi surimija proizvedenog iz Alaske ugotice. Kako bi se proizveo kvalitetan surimi, najvažnija je brza prerada ribe nakon ulova, dakle prije nastupanja postmortalnih promjena mesa. Proces proizvodnje je automatiziran (**Slika 3**) i sastoji se od sljedećih faza:

- priprema,
- miješanje s krioprotektorima,
- prešanje u blokove mase 10 +/- 0,1 kg,
- pakiranje u polietilenske vrećice i
- kontaktno zamrzavanje kondukcijom.

Kao krioprotektori najčešće se koriste mono- i disaharidi, šećerni alkoholi te dikarboksilne kiseline. Polietilenske vrećice pokazale su se najdjelotvornijima zbog sprječavanja dehidracije surimija i kristalizacije isparene vode na rashladnim površinama izmjenjivača topline. Time doprinose očuvanju mase i kvalitete te pospješuju ekonomičnost procesa zamrzavanja. Strojno prešanje i pakiranje blokova surimija vrši se u vakuumu zbog izbjegavanja

inkorporacije zraka i stvaranja zračnih džepova. Skladištenje zamrznutog surimija vrši se na temperaturama ispod  $-20^{\circ}\text{C}$ , i to najčešće pri  $-25^{\circ}\text{C}$  (Kovačević, 2001.).



**Slika 3** Tehnološka shema proizvodnje surimija (Kovačević, 2001.)

#### 2.4.2. Tehnologija proizvodnje pilećeg surimija

Miofibrilarni proteini su najznačajniji proteini strojno otkošenog pilećeg mesa. Primarno su našli tehnološku primjenu u proizvodnji jeftinih mesnih proizvoda niskog roka trajanja koji su podvrgnuti toplinskoj obradi. Raspon primjene miofibrilarnih proteinskih izolata znatno se širi. Postoji mogućnost zamjena i uporaba mišića pilećih prsa kao vezivnog sredstva u restrukturiranim proizvodima ili kao dodatak skupljim i stabilnijim mesnim proizvodima. Tako se miofibrilarni proteini pilećeg mesa mogu koristiti u proizvodnji pilećeg surimija (Stangierski i sur., 2012.).

Pileći surimi je koncentrat miofibrilarnih proteina pilećeg mesa. Proizvodi se prema tehnologiji proizvodnje ribljeg surimija. Za proizvodnju mesa najveći značaj ima meso mladih tovnih pilića brojlera koji su komercijalni hibridi. Imaju izražena sljedeća svojstva: brzi rast, dobro iskorištenje hrane, otpornost na bolesti, povećanu mesnatost prsa, bataka i zabataka, manju masnoću, izvrsnu kvalitetu mesa, itd. Zbog bržeg prirasta, boljeg razvitka skupljih dijelova tijela, boljeg klaoničkog radmana te bijelog perja koje se strojno bolje uklanja što poboljšava

senzorska svojstva i povećava tržišnu vrijednost mesa, upotrebljavaju se muške linije pasmina. Od linijskih hibrida teških pasmina u Republici Hrvatskoj najzastupljeniji su Hybro, Ross, Lohmann, Hubbars, Arbor Acres i drugi. Kod određenih pasmina brojlera može doći do nastanka vodnjikavog mesa (naročito prsnih mišića) sličnog BMV mesu svinja. Tako meso je slabije tehnološke vrijednosti: slabija SpVV, blijeda boja, mekša konzistencija, loša emulzijska sposobnost, smanjena sposobnost stvaranja gela, itd. Pilići uzgojeni tzv. "Free range" ili slobodnom uzgoju tovnih pilića imaju bolja organoleptička i druga svojstva (Kovačević, 2001.).

Konačna kvaliteta gelova dobivenih iz ispranog strojno otkošenog pilećeg mesa nije uvijek identična i značajno ovisi o sirovini i parametrima iskorištenja, npr. broj ispiranja, vrsta sredstva za ispiranje, omjeru pilećeg mesa i vode, itd. (Stangierski i sur., 2012.).

## **2.5. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DMK)**

Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DMK) je termička metoda koja se najčešće koristi u analizi hrane (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.). Zasniva se na mjerenju razlike toplinskog toka između uzorka i referentne tvari. Referentna tvar ne pokazuje nikakvu termičku aktivnost u mjerenom temperaturnom rasponu zbog čega se promjene uzorka mogu mnogo preciznije zabilježiti nego kad se mjeri samo apsolutna temperatura uzorka (Mastanjević, 2010.).

Tijekom zagrijavanja ili hlađenja uzorka kontroliranom brzinom u komoricama, mjeri se energija koja je potrebna da razlika temperature između uzorka i referentne tvari bude nula (Nedić Tiban, 2005.). Temperatura se mjeri kontinuirano pomoću temperaturnih sondi. Grijači prema potrebi opskrbljuju jednu ili drugu komoricu toplinom sve dok ne dođe do izjednačavanja temperatura uzorka i referentnog materijala. Uzorak će apsorbirati ili oslobađati toplinu u slučaju faznog prijelaza (taljenja, kristalizacije, isparavanja, kondenzacije, sublimacije i staklastog prijelaza). Tada je potrebno dovesti ekvivalentnu količinu topline ili uzorku ili referentnom materijalu kako bi se uravnotežila temperatura obiju komorica (Mastanjević, 2010.).

Instrument koji se koristi za provedbu ove metode naziva se diferencijalni motridbeni kalorimetar (engl. DSC – Differential Scanning Calorimetry) koji se najčešće koristi od svih termo-analičkih instrumenata. DMK mjeri termičke promjene u funkciji:

- a) vremena, održavajući temperaturu referentnog i analiziranog uzorka konstantnom (izotermno),
- b) temperature, tako da se i uzorak i referentna tvar griju istom brzinom zagrijavanja (dinamički) (Nedić Tiban, 2005.).

Podaci DMK analize prikazuju se termogramima kao brzina apsorbirane energije/dovedene energije (Q) od strane uzorka u odnosu na referentni materijal (razlike toplinskog toka) u ovisnosti o vremenu ili temperaturi (okoline ili uzorka). Toplinski tok odgovara prenesenoj energiji i mjeri se u watima (W) ili miliwatima (mW). Ukoliko se mjeri prenesena energija u vremenu, mjerna jedinica je mW ili J. Zbog mogućnosti mjerenja i interpretacije utjecaja okoline i procesnih uvjeta DMK dijagrami pridonose optimizaciji toplinskih procesa. (Mastanjević, 2010.).

Zbog sposobnosti mjerenja toplinskog toka reda veličine  $\mu\text{W}$ , odnosno visoke osjetljivosti DMK metode, primjena je gotovo neograničena. DMK metodom mogu se zabilježiti svake fizikalne promjene ili kemijske reakcije u kojima dolazi do oslobađanja ili trošenja vrlo malih količina energije. U prošlosti su toplinske metode uglavnom bile usmjerene na proučavanje polimera, no stalnim usavršavanjem tehnike i automatizacijom, primjena DMK metode konstantno se proširuje na nova područja primjene. Danas se koristi u farmaceutskoj, kemijskoj, prehrambenoj i petrokemijskoj industriji gdje se koristi za istraživanje termičkih svojstava te za rutinske analize i kontrolu kvalitete uzoraka tijekom proizvodnje i gotovih proizvoda (Mastanjević, 2010.).

Najvažnija primjena DMK u prehrambenoj industriji usmjerena je na istraživanja:

- stabilnosti i denaturacije proteina,
- faznih prijelaza vodenih sustava škrobova,
- toplinske želatinizacije polisaharida,
- faznog ponašanja zamrznutih ugljikohidratnih sustava,
- karakterizacije staklastog prijelaza i kriostabilizacije hrane,
- točke taljenja i stupnja kristalizacije lipida,
- stabilnosti na oksidacijske procese,
- uz odgovarajuće konstrukcijske modifikacije DMK je pouzdana, precizna i relativno brza metoda za određivanje toplinske provodljivosti hrane (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.).

Za dobivanje podataka DMK analizom mogu se koristiti dva različita sustava (Nedić Tiban, 2005.):

- a) DMK toplinskog toka (eng. Heat-flux DSC) i
- b) DMK kompenziranog toplinskog toka (eng. Power compensation DSC).

### 2.5.1. DMK toplinskog toka

DMK metodom moguće je provoditi kvantitativna mjerenja zbog dobro definirane termičke otpornosti u ćeliji.

Toplinski tok  $Q_s$  prema uzorku potječe od ogrjevnice stjenke i referentne tvari te se može izračunati prema **formuli (1)**:

$$Q_s = Q_{cs} + Q_{rs} = K_{cs}(T_c - T_s) + K_{rs}(T_r - T_s) \quad [kJh^{-1}] \quad \mathbf{1}$$

**gdje** je:  $K_{cs}$  – koeficijent prijenosa topline između ogrjevnice stjenke i uzorka ( $kJ h^{-1} m^{-2} K^{-1}$ )

$K_{rs}$  – koeficijent prijenosa topline između referentne tvari i uzorka ( $kJ h^{-1} m^{-2} K^{-1}$ )

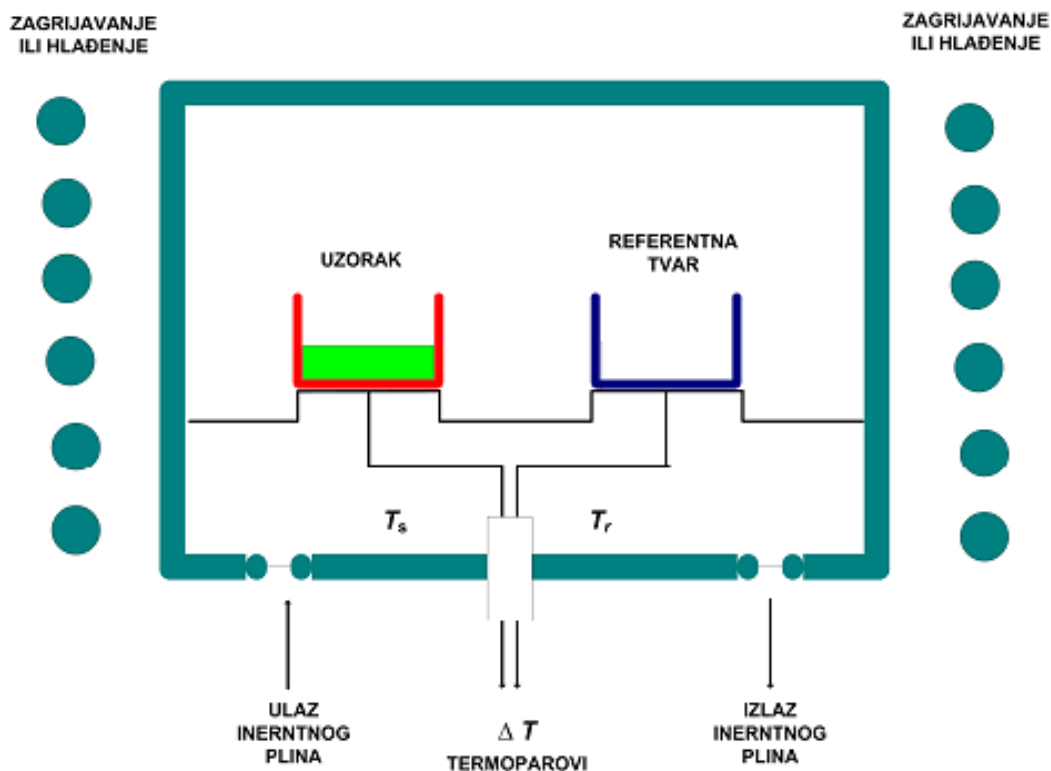
$T_c$  – temperatura ogrjevnice stjenke ( $^{\circ}C$ )

$T_s$  – temperatura uzorka ( $^{\circ}C$ )

$T_r$  – temperatura referentne tvari ( $^{\circ}C$ ).

Na metalnim pločama smještene su male posudice u kojima se nalaze uzorak i referentna tvar (**Slika 4**). Metalne ploče služe za kontrolirani prijenos topline od izvora topline do uzorka i referentne tvari. Na njima se provodi mjerenje temperature, odmah ispod posudica. Time se eliminira utjecaj promjena termičkom otporu uzorka što rezultira mogućnošću preciznog mjerenja promjene entalpije (Mastanjević, 2010.; Nedić Tiban, 2005.).





Slika 4 Shema komore DMK toplinskog toka (Mastanjević, 2010.)

### 2.5.2. DMK kompenziranog toplinskog toka

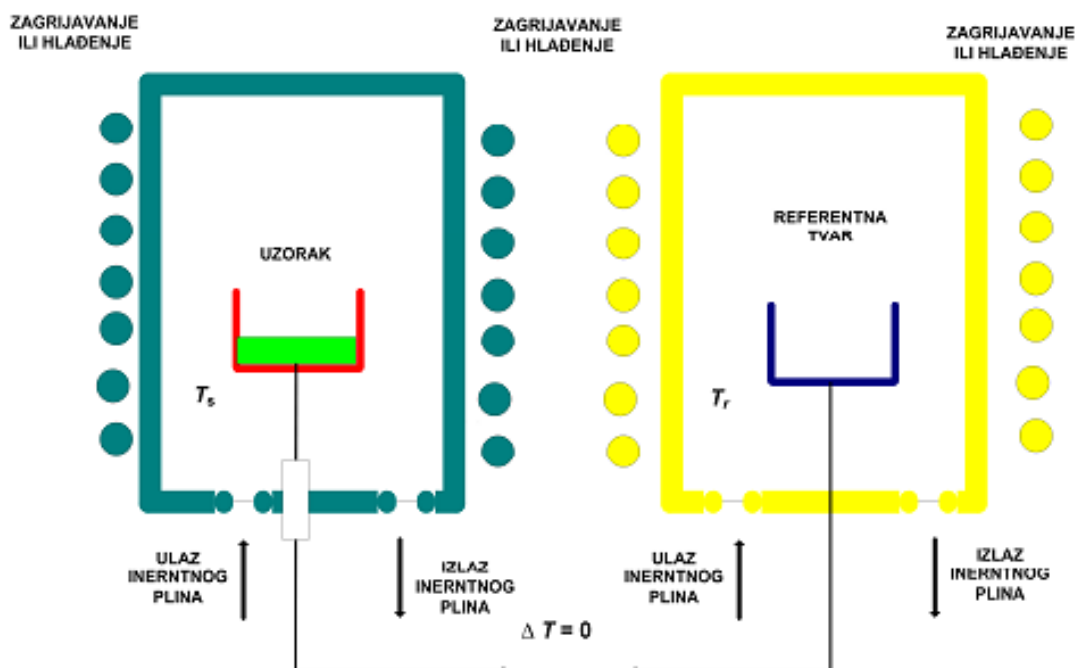
Uzorak i referentna tvar su potpuno odvojeni jedan od drugog. Smješteni su u odvojenim komorama sa senzorima i sustavom za kontrolirano grijanje i hlađenje. Svaka posudica zasebno ima vlastiti izvor topline i temperaturno osjetilo (**Slika 5**). Temperaturni programator služi za održavanje iste temperature uzorka i referentne tvari, dok elektronički krug regulira dovodjenje i odvođenje topline prema držačima uzoraka, kako bi se temperaturna razlika održala na nuli. Količina kompenzacijske energije proporcionalna je toplinskom efektu endotermne ili egzotermne transformacije koja se događa u uzorku. Odgovarajuća promjena entalpije može se neposredno izmjeriti (Mastanjević, 2010.; Nedić Tiban, 2005.).

Razlika toplinskog toka ( $Q_s - Q_r$ ) mjerena je kompenzacijom s električnom strujom, pa imamo  $Q_{e,r}$  i  $Q_{e,s}$  odakle slijedi **formula (2)**:

$$\Delta Q_e = (Q_{e,r} - Q_{e,s}) = (C_s - C_r) \cdot dT_r/dT - C_s/K \cdot d(\Delta Q_e)/dt + q \quad 2$$

gdje je:  $C_s$  – toplinski kapacitet uzorka i posudice ( $\text{kJ kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

$C_r$  – toplinski kapacitet referentne tvari ( $\text{kJ kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ ).



Slika 4 Shema komore DMK kompenziranog toplinskog toka (Mastanjević, 2010.)

### 2.5.3. Primjena DMK u analizi proteina

DMK metodom može se proučavati termička denaturacija tkivnih proteina, enzima i utjecaj različitih dodataka na svojstva proteina, odnosno konformacijske promjene do kojih je došlo djelovanjem različitih čimbenika.

Toplinska denaturacija proteina na DMK dijagramu se uočava kao endotermni vrh jer je raspadanje intermolekularnih vodikovih veza endotermna reakcija. Suprotno tome, pucanje hidrofobnih veza je egzotermna reakcija što može utjecati na određivanje ukupne entalpije ( $\Delta H$ ) (Mastanjević, 2010.).

Kod procjene potrebne toplinske energije za denaturaciju proteina, za proračun vrijednosti entalpije ( $\Delta H$ ) može poslužiti površina ispod prijelaznog vrha. Temperatura denaturacije se najčešće uzima kao temperatura vrha koju je moguće odrediti sa prijelaza. Aditivi koji se mogu naći u uzorku mogli bi otežati određivanje procesnih uvjeta kao i određivanje sadržaja i vrste aditiva u ispitivanoj namirnici (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.).

#### **2.5.4. Primjena DMK za određivanje krioprotektorske djelotvornosti zamrznute hrane**

Metodom nisko temperaturne DMK je omogućeno proučavanje zamrznutih proizvoda, odnosno procjenjivanje sličnosti između sintetičkih amorfnih polimera i staklasto formiranih vodenih sustava. Upotrebljava se zajedno s drugim termoanalitičkim tehnikama za proučavanje sastojaka hrane u tehnologiji kriostabilizacije s obzirom na njihovu kemijsku i teksturalnu stabilnost (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.).

Usporedbe entalpije endotermne reakcije denaturacije izoliranih miofibrilarnih proteina ( $\Delta H$ ) tijekom zagrijavanja u temperaturnom intervalu od 10 do 100 °C te usporedbe temperatura u kojima se denaturacije događaju, upotrebljavaju se za praćenje intenziteta denaturacije miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju. Zamrzavanjem i skladištenjem u zamrznutom stanju smanjuju se vrijednosti entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina. Vrijednosti entalpije koja opisuje toplinsku denaturaciju izoliranog miozina i aktina rezultat je uvjeta skladištenja, masenog udjela i vrste dodanih krioprotektora (Mastanjević, 2010.).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- a) pripremiti uzorke pilećeg surimija postupkom višestrukog ispiranja destiliranom vodom,
- b) odrediti  $a_w$ , pH i osnovni kemijski sastav uzoraka pilećeg surimija i
- c) diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom odrediti temperature i entalpije denaturacije miofibrilarnih proteina pilećeg surimija, pomiješanih s različitim modificiranim škrobovima ( $w = 5\%$  i  $10\%$ ), nakon skladištenja 30 dana pri  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. MATERIJAL I METODE

Uzorci pilećih surimija (MPC) pripremljeni su u laboratoriju iz mesa mladih tovnih pilića - brojlera (uglavnom *Pectoralis major M.* i *Pectoralis minor M.*) po metodi prema Yang i Froning-u (1992.) s izmjenama. Umjesto vodovodne vode, za pranje i ispiranje mesa koristila se destilirana voda. DMK mjerenja provedena su na uzorcima pilećeg surimija kojima su dodani modificirani škrobovi tapioke i ječma. Maseni udjeli modificiranih škrobova su 5 i 10 % kao postotak od ukupne mase. Uzorci pilećih prsa pripremljeni su u laboratoriju odvagom na analitičkoj vagi Tehnica ET – 1111 s točnošću mjerenja mase  $\pm 1\text{ mg}$ .

#### 3.2.1. Modifikacija izoliranog škroba iz ječma (MBS) i tapioke (MTS1 i MTS2)

Modifikacija izoliranog škroba iz ječma (MBS) provedena je sljedećim postupkom:

- Pripravljena je smjesa glutarne kiseline i acetanhidrida suspendiranjem 0,2904 g glutarne kiseline u 4,35 g acetanhidrida. U 145 mL destilirane vode suspendirano je 100 g škroba te je suspenzija homogenizirana miješanjem na magnetskoj miješalici (300 rpm) tijekom 30 min. pH suspenzije škroba podešen je na 9,0 sa 1M NaOH te je, uz održavanje pH oko 9, dokapavana smjesa glutarne kiseline i acetanhidrida.
- Po završetku dodavanja reagensa za modifikaciju, škrobna suspenzija miješana je još 30 min, tako da je ukupno vrijeme trajanja reakcije iznosilo oko 2 sata.
- Reakcija je prekinuta podešavanjem pH na 5,0 s 1 M HCl te je suspenzija centrifugirana pri 3000 rpm tijekom 5 min kako bi se izdvojio škrob. Škrob je ispiran destiliranom vodom uz centrifugiranje (3000 rpm, 5 min) do obezbojenja supernatanta. Suspenzija

škroba je neutralizirana, još jednom centrifugirana te je modificirani škrob osušen na zraku. Suhom škrobu (MBS) određen je udio suhe tvari (sušenjem na 130°C, 90 min).

Modifikacija izoliranog škroba iz tapioke (MTS1) provedena je sljedećim postupkom:

- Modificirani škrob iz tapioke (MTS1) pripremljen je po metodi prema Wurzburgu (1960.). U 145 mL destilirane vode suspendirano je 100 g suhe tvari škroba te je suspenzija homogenizirana miješanjem na magnetskoj miješalici (300 rpm) tijekom 30 min. Smjesa azelainske kiseline i acetanhidrida pripravljena je suspendiranjem 0,1452 g kiseline u 4,35 g acetanhidrida. pH suspenzije škroba u vodi podešen je na 9,0 dokapavanjem 1M NaOH te je, uz održavanje pH oko 9, dokapavana smjesa kiseline i acetanhidrida.
- Po završetku dodavanja reagensa za modifikaciju škrobna suspenzija miješana je još 30 min, tako da je ukupno vrijeme trajanja reakcije iznosilo oko 2 sata.
- Reakcija je prekinuta podešavanjem pH na 5,0 s 1 M HCl te je suspenzija centrifugirana pri 3000 rpm tijekom 5 min kako bi se izdvojio talog škroba. Izdvojeni talog je ispiran destiliranom vodom uz centrifugiranje (3000 rpm, 5 min) do obezbojenja supernatanta. Suspenzija škroba je neutralizirana, još jednom centrifugirana te je izdvojeni modificirani škrob osušen na zraku. Suhom škrobu određen je udio suhe tvari (130 °C, 90 min).

Modificirani škrob iz tapioke MTS2 pripremljen je istim postupkom kao i modificirani škrob iz ječma (MBS), samo je upotrebjeno 0,1452 g glutarne kiseline u 4,35 g acetanhidrida kao agens za modifikaciju.

### 3.2.2. Priprema uzoraka pilećeg mesa

Priprema pilećeg surimija provedena je u tri faze (**Slika 6**):

- 1. faza

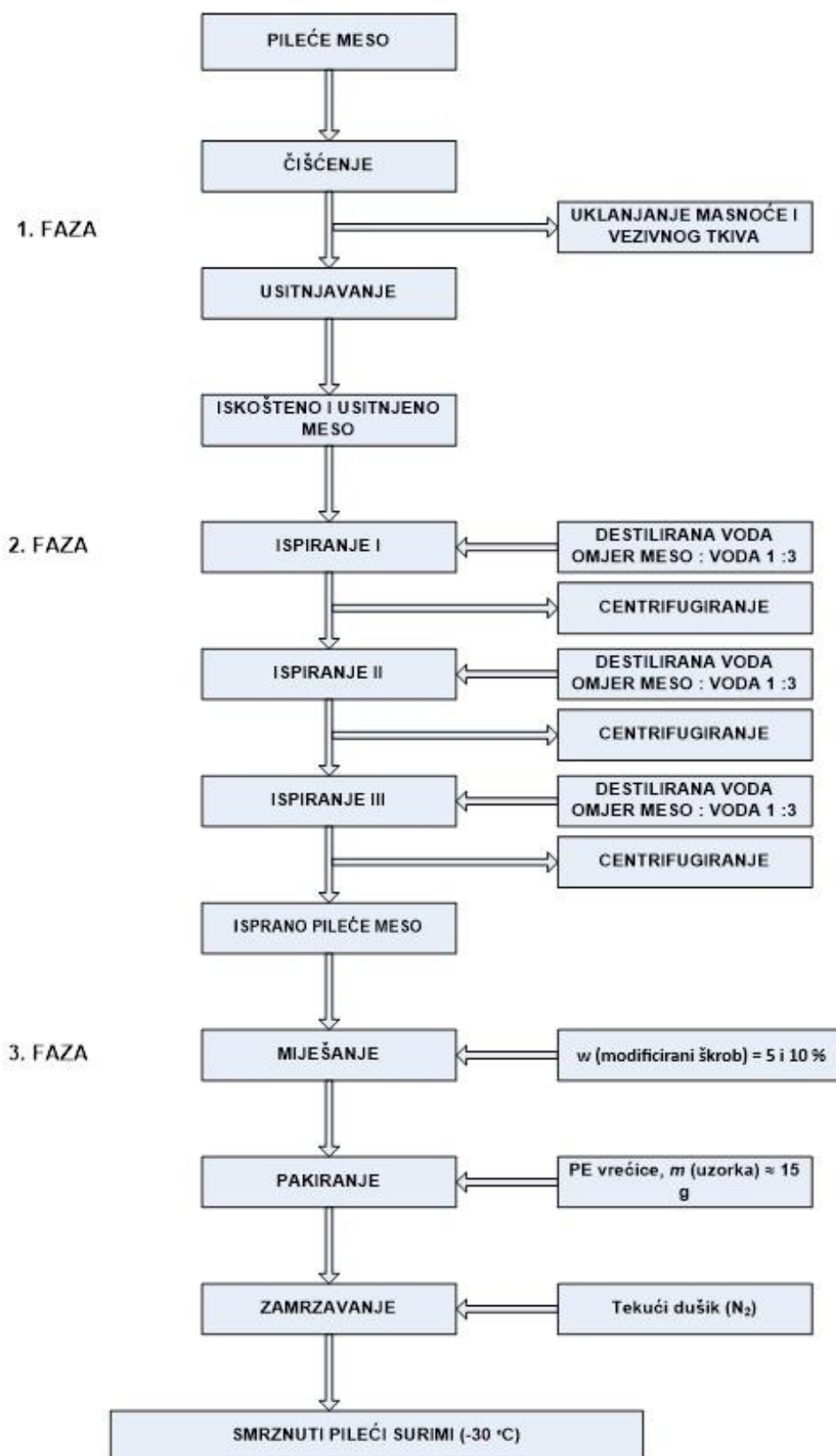
Nakon skidanja kože, iskoštavanja i odstranjivanja preostale masnoće i većih nakupina vezivnog tkiva, meso pilećih prsa usitni se strojem za mljevenje (usitnjavanje) mesa, propuštanjem u dva navrata, kroz rešetku s otvorima promjera  $2r = 2 - 4$  mm. Povećanjem promjera povećava se iskorištenje sirovine, ali se postiže manja kvaliteta ispranog pilećeg mesa.

- 2. faza

Usitnjeno pileće meso se ispiri destiliranom vodom. Iako se ispiranjem usitnjenog pilećeg mesa smanjuje iskorištenje sirovine, doprinosi se stabilnosti miofibrilarnih proteina te osiguravaju bolja želirajuća svojstva ispranog pilećeg mesa. Usitnjeno pileće meso se najprije ispiri destiliranom vodom, 15 minuta u mješalici pri umjerenoj brzini mješanja ( $250 \text{ okretaja min}^{-1}$ ) pri  $4^\circ\text{C}$ . Omjer mesa i vode tijekom ispiranja iznosi 1 : 3. Nakon mirovanja obire se izdvojena mast i centrifugira 15 minuta na  $800 \text{ g}$  pri  $4^\circ\text{C}$ , postupak se ponavlja tri puta, nakon čega je određen osnovni kemijski sastav prema AOAC metodi 2007,4 na Food Scan Meat Analysr-u (Jovanovac, 2009).

- 3. faza

Pileći surimi se uzorkuje i miješa s modificiranim škrobom u različitim omjerima. Maseni udjeli modificiranih škrobova su 5 i 10 %. Određeni su kao udio od ukupne mase. Nakon pripreme od ukupno sedam uzoraka mase po  $\approx 10 \text{ g}$  svaki, uzorci su zatvoreni u polietilenske vrećice, označeni i zamrznuti u struji tekućeg dušika. Skladišteni su na  $-30^\circ\text{C}$  po minuti. Tijekom eksperimenta računalom se prati svaka promjena temperature i toplinskog tijeka u zadanom rasponu od  $25^\circ\text{C}$  do  $95^\circ\text{C}$ , s brzinom zagrijavanja od  $10^\circ\text{C}$  po minuti. Po završetku eksperimenta dobije se DMK krivulja iz koje se pomoću STAR<sup>e</sup> software-a određuju vrijednosti promjene entalpije aktina  $\Delta H_a$  i miozina  $\Delta H_m$ ,  $T_o$  – početna ("onset") i  $T_e$  – završna ("endset") temperatura denaturacije miozina i aktina te  $T_p$  – temperatura denaturacije aktina i miozina analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom modificiranih škrobova izoliranih iz ječma i tapioke (MBS, MTS1 i MTS2).



Slika 5 Shema tijeka proizvodnje pilećeg surimija



### 3.2.3. Određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg surimija

Kalorimetar tvrtke Mettler-Toledo model 822e (**Slika 7**) korišten je određivanje temperature i entalpija denaturacije uzorka, a mjerenja su provedena u atmosferi dušika čistoće 5.0 (Linde). Uređaj je opremljen keramičkim senzorom FRS 5 s 56 termoparova (Au/Au/Pd). Kolorimetar omogućuje izvođenje dinamičkih mjerenja u temperaturnom području od -150 °C do 500 °C. Bazira se na DSC metodi toplinskog toka. Opremljen je STAR<sup>e</sup> software-om, odnosno s pet različitih programa koji su međusobno povezani preko baze podataka:

- 1) instalacijski program (eng. Install window) sadrži sistemsku konfiguraciju i module pomoću kojih se definira mjerno područje, kalibracijski materijali, plinovi i posudice koje su u primjeni,
- 2) kontrolni modul program (eng. Module control window) prikazuje modul povezan sa software-om, koji radi izravno preko računala te pokazuje eksperiment koji je u tijeku te omogućava kreiranje jednostavnih metoda i eksperimenata za rutinske analize,
- 3) program za različite metode (eng. Method window) omogućuje kreiranje temperaturnih programa mjerenja,
- 4) program za izvođenje eksperimenta (eng. Experiment window) služi za odabir metode mjerenja s unosom podataka specifičnim za eksperiment ( ime uzorka, masa uzorka, priprema uzorka),
- 5) evaluacijski program (eng. Evaluation window) služi za analizu krivulja, tj. obradu rezultata.

U bazi podataka STAR<sup>e</sup> sustava dostupne su četiri kalibracijske metode: totalna kalibracija In/Zn; totalna kalibracija n-oktan/In; višestruka kalibracija temperature In/Zn (eng. Multiple In/Zn); jednostruka kalibracija temperature s In ili Zn (eng. Single In; eng. Single Zn). U radu je korištena totalna kalibracija n-oktan/In, dok je kalibracija toplinskog toka napravljena s indijem (In).

Kontrola ili provjera (tzv. Check) pouzdanosti instrumenta (modula), koja određuje razliku izmjerene i određene referentne vrijednosti temperature ili toplinskog toka ispitivanog referentnog materijala rađena je s indijem prije svakog mjerenja te nakon punjenja kontejnera s komprimiranim i tekućim dušikom. U radu je korištena opcija hlađenja s tekućim dušikom (kontejner od 100 L, Messer, Frankfurt).

Mjerenje se provodi tako da se eksperimentalni parametri unose u temperaturni program za pojedine segmente (korake) u mjernom modulu. Tijekom mjerenja, mjerni podaci se kontinuirano šalju iz DSC 822e modula prema računalu. Podaci su prezentirani kao "on-line" krivulje u kontrolnom modul programu (eng. Module control window).



**Slika 6** DMK kalorimetar tvrtke Mettler-Toledo model 822e

([https://www.google.com/search?q=dsc+mettler+toledo+882e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwidsNymm5bgAhUix4UKHQDiD5IQ\\_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgsrc=SiUqC1U1VBdgDM:](https://www.google.com/search?q=dsc+mettler+toledo+882e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwidsNymm5bgAhUix4UKHQDiD5IQ_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgsrc=SiUqC1U1VBdgDM:))

Umjeravanje instrumenta je prvi korak svake termo-analičke studije. Njime se podrazumijeva skup postupaka koji pod specifičnim uvjetima određuju odnos između vrijednosti veličine dobivene u mjernom instrumentu ili mjernom sustavu i odgovarajućih vrijednosti standarda. Najvažnije veličine u DMK su temperatura (ili vrijeme) i diferencijalna (razlika) energija (toplinski tok /toplinski kapacitet ili toplina/entalpija). Umjeravati se mogu temperatura, karakteristike komore i DMK senzor, odnosno toplinski tok (Nedić Tiban, 2005.).

Umjeravanjem se podešavaju instrumentalni parametri s ciljem vraćanja izmjerenih vrijednosti prema referentnima. Provodi se prije početka rada s novim uređajem i onda kada provjera (tzv. "check") nije dala dobre rezultate. U dobroj laboratorijskoj praksi "check" se provodi jednom mjesečno. Bazira se na mjerenju termičkim svojstava indija visoke čistoće (početne, engl. "onset" temperature taljenja i topline taljenja indija):

- In "onset" =  $T_{oi} = 156,6\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$ ,
- "Heat flow" =  $\Delta H_{ti} = 28,45\text{ °C} \pm 0,6\text{ J g}^{-1}$  (Nedić Tiban, 2005.).

### *Priprema uzoraka pilećeg surimija za određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina*

Za mjerenje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg mesa upotrebene su odvage uzoraka od  $15 \pm 2$  mg. Prije svakog mjerenja smrznuti uzorci su ostavljeni preko noći u hladnjaku na  $+4$  °C radi odmrzavanja. U ovom istraživanju sva DSC mjerenja provedena su u tri paralele. Uzorci pilećeg mesa izvagani su u standardnu aluminijsku posudicu (40  $\mu$ L). Odmah nakon hermetičkog zatvaranja posudice provedeno je DSC mjerenje. Za određivanje temperature i entalpija denaturacije uzorci su bili podvrgnuti temperaturnom programu zagrijavanja od 25 °C do 95 °C, s brzinom zagrijavanja od 10 °C min<sup>-1</sup>.

### *Određivanje temperature denaturacije miofibrilarnih proteina pilećeg surimija*

Rezultati se obrađuju pomoću numeričke evaluacije i grafičkih postupaka programa za evaluacije (eng. Evaluation window) STAR<sup>®</sup> software-a. Područje evaluacije može se odabrati crtanjem okvira u području u kojem se želi napraviti evaluacija ili pomoću "auto limita", koji omogućava automatsko određivanje termičkih promjena. Numeričke evaluacije obuhvaćaju početne i krajnje točke određenih promjera, integracije s različitim baznim linijama, temperature vrha (pika) krivulje (eng. Peak temperature) sa i bez ekstrapolacije, itd. Tim načinom se omogućuje precizno određivanje entalpije različitih promjena i mjerenje temperatura reakcija. Dio DMK krivulje u kojem se ne odvijaju termičke promjene naziva se bazna linija. Vrsta bazne linije određuje dobivene rezultate. Zbog toga mora biti pažljivo odabrana (ovisi o termičkom efektu ili promjeni koja se ispituje, odnosno dijelu krivulje koji se želi evaluirati) (Babić, 2007.; Nedić Tiban, 2005.).

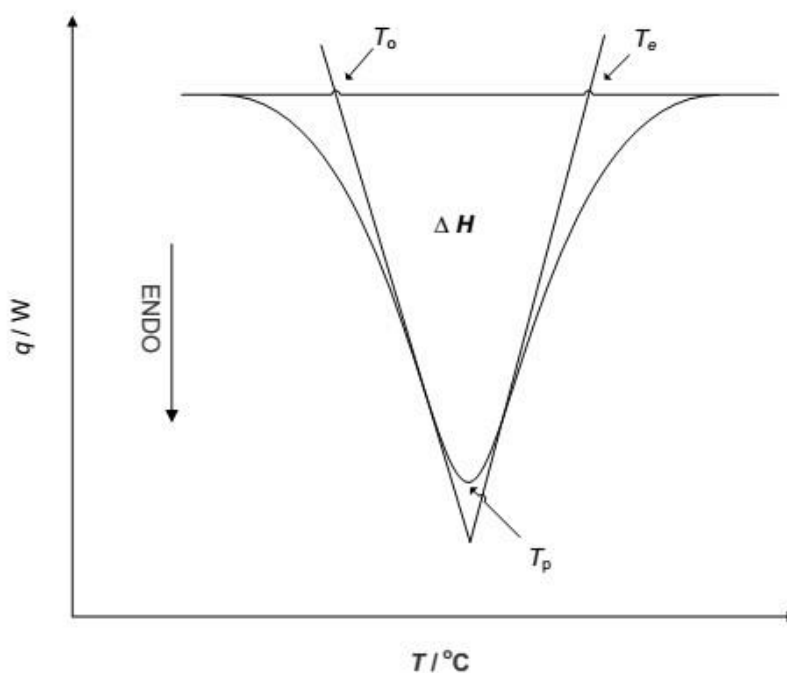
Pik (vrh) krivulje je određen (Nedić Tiban, 2005):

1. mjestom (pozicijom) - npr. početnom, krajnjoj, ekstrapoliranom početnom temperaturom i temperaturom vrha krivulje,
2. veličinom - odnosi se na masu uzorka i energiju reakcije, i
3. oblikom - može biti povezan s kinetikom procesa.

Prema ASMT standardu (eng. American Society for Testing and Materials) definirane su i:

- temperatura pika ( $T_p$ ) (vrha krivulje) – temperatura koja odgovara maksimalnoj defleksiji DMK krivulje,

- početna (eng. Onset) temperatura ( $T_o$ ) – temperatura kod koje je prisutno prvo odvajanje defleksija (savijanje) krivulje od bazne linije,
- završna temperatura (eng. Endset) ( $T_e$ ) – temperatura sjecišta ekstrapolirane bazne linije i uzlazne krivulje pika (Slika 8).



**Slika 8** Određivanje početne ( $T_o$ ), završne ( $T_e$ ) i temperature vrha ( $T_p$ ) te entalpije ( $\Delta H$ ) neke promjene u uzorku

#### *Određivanje entalpije denaturacije ( $\Delta H$ ) miofibrilarnih proteina pilećeg surimija*

Entalpija različitih promjena u analiziranom uzorku dobiva se integriranjem površine vrha (pika) krivulje (Slika 9). Zbog vrlo male mase uzoraka korištenih u DMK analizi (10 - 20 mg) javlja se problem reproducibilnosti rezultata te je neophodna dobra homogenizacija uzorka i provedba više paralelnih mjerenja.

#### **3.2.4. Određivanje pH vrijednosti i osnovnog kemijskog sastava**

Vrijednost pH mjerena je uređajem pH/lon – Bench pH/lon/mV meter (Eutech Instruments Pte Ltd/Oakton Instruments, USA), prema ISO normi 2917:1999 (HRN ISO 2917, 2000) te uputama proizvođača (pH/lon 510 Instruction Manual). Terenska mjerenja pH vrijednosti

provedena su pomoću prijenosnog pH metra pH 3210/3310 tvrtke WTW prema normi (HRN ISO 2917:2000), (HNZ, 2000.).

Određivanje udjela vode, bjelančevina i ukupnih masti provedena je pomoću uređaja FoodScan Meat Analysera (FOSS) (**Slika 9**). Određivanje je vršeno prema AOAC metodi 2007.4 (AOAC, 2007.).



**Slika 9** FoodScan Meat Analyser

### 3.2.5. Određivanje aktiviteta vode ( $a_w$ )

Određivanje  $a_w$  se provodilo pomoću uređaja HygroLab 3 – Multi-channel Humidity & Water Activity Analyser (ROTRONIC) (**Slika 10**), prema uputama proizvođača (HygroLab Bench Top Humidity Temperature Indicator Instruction Manual V2.0), pri sobnoj temperaturi ( $20 \pm 2$  °C).



**Slika 10** HygroLab 3 – Multi-channel Humidity Water Activity Analyser

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Od svakog uzorka izmjerene su tri vrijednosti za osnovni kemijski sastav, pH,  $a_w$ , početne ( $T_o$ ), završne ( $T_e$ ) i temperature denaturacije ( $T_p$ ), te entalpije denaturacije ( $\Delta H$ ). Eksperimentalni podaci za temperature i entalpije denaturacije analizirani su analizom varijance (one-way ANOVA) i Fisherovim LSD testom "najmanje značajne razlike" (eng. Least significant difference). Statistička analiza provedena je upotrebom Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK. SAD), a statistički značajne razlike izražene su na razini vjerojatnosti od 95% ( $P < 0,05$ ).



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



#### 4.1. REZULTATI

Rezultati istraživanja, odnosno provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada:

- 1) Određivanje osnovnog kemijskog sastava,  $a_w$  i pH uzoraka pilećeg surimija (**Tablica 2**)
- 2) Određivanje pH vrijednosti uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima modificiranog škroba nakon 30 dana skladištenja u zamrznutom stanju pri -30 °C (**Tablica 3**)
- 3) Određivanje temperatura denaturacije ( $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_e$ ) i entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) miozina i aktina uzoraka pilećeg surimija primjenom DMK (**Tablica 3, Tablica 4; Slika 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17**)

**Tablica 2** Osnovni kemijski sastav,  $a_w$  i pH uzoraka pilećeg surimija

| <i>Grativna tvar/parametar</i> | <i>Maseni udio (%)</i> |
|--------------------------------|------------------------|
| <i>Voda</i>                    | 83,75 ± 0,35           |
| <i>Proteini</i>                | 15,61 ± 0,42           |
| <i>Masti</i>                   | 0,71 ± 0,17            |
| <i>pH</i>                      | 6,22 ± 0,07            |
| <i><math>a_w</math></i>        | 0,99 ± 0,01            |

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 3** pH vrijednosti pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima modificiranih škrobova (MTS1, MTS2 i MBS) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

| <i>w (%)</i> | <i>pH</i>   |
|--------------|-------------|
| 0            | 5,89 ± 0,01 |
| 5 (MTS1)     | 5,93 ± 0,01 |

|           |             |
|-----------|-------------|
| 10 (MTS1) | 5,91 ± 0,01 |
| 5 (MTS2)  | 5,87 ± 0,02 |
| 10 (MTS2) | 5,92 ± 0,01 |
| 5 (MBS)   | 5,81 ± 0,01 |
| 10 (MBS)  | 5,92 ± 0,01 |

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 4** Temperature denaturacije ( $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_e$ ) i entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) miozina uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima modificiranih škrobova (MTS1, MTS2 i MBS) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

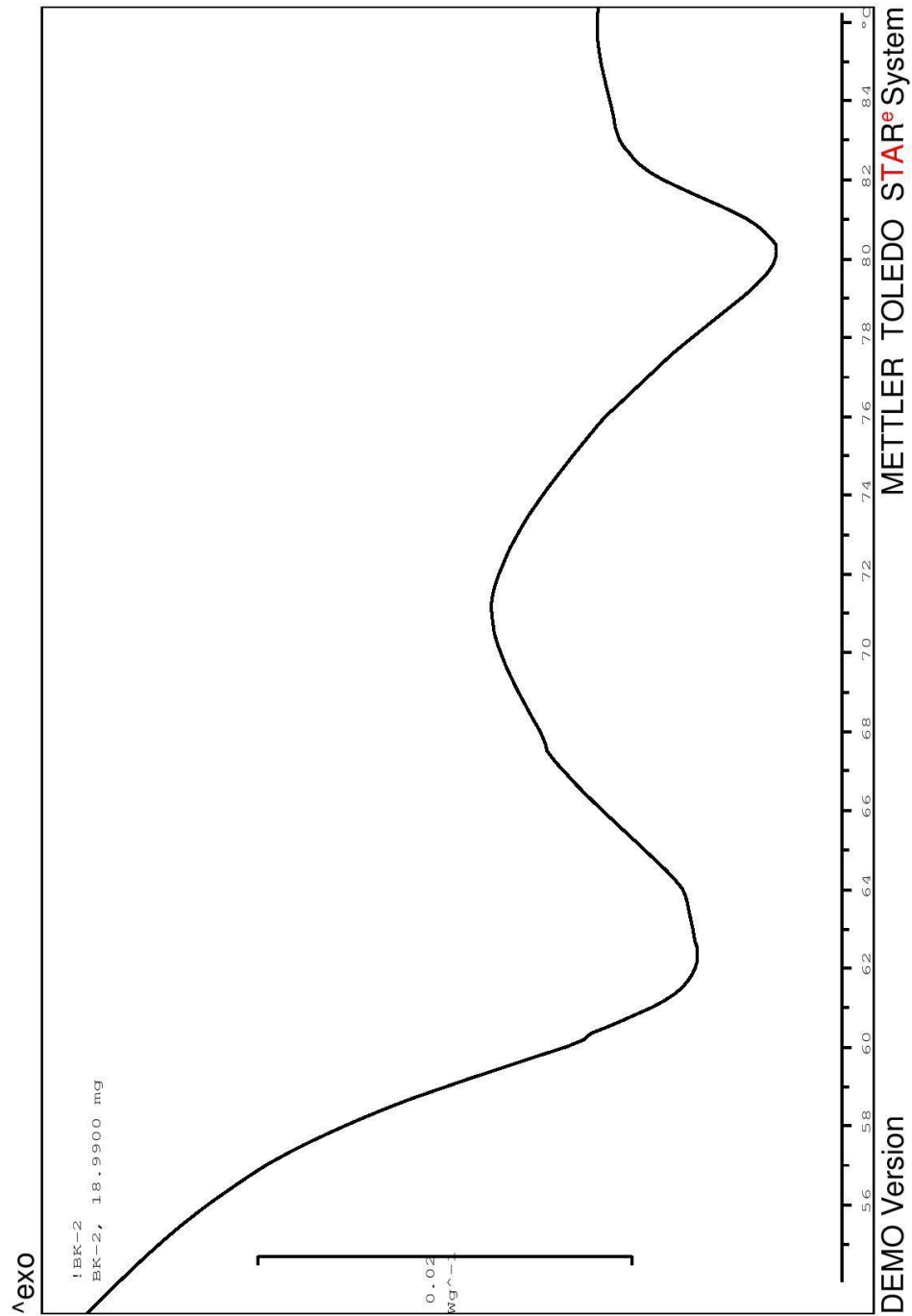
| $w$ (%)   | $T_o$ (°C)                 | $T_p$ (°C)                 | $T_e$ (°C)                  | $\Delta H_m$ (J g <sup>-1</sup> ) |
|-----------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0         | 56.47 <sup>bc</sup> ± 0.18 | 61.43 <sup>b</sup> ± 0.04  | 69.06 <sup>a</sup> ± 0.18   | 6.95 <sup>b</sup> ± 0.03          |
| 5 (MTS1)  | 57,38 ± 0.47               | 61.29 <sup>bc</sup> ± 0.04 | 67.04 <sup>abc</sup> ± 0.08 | 3.03 <sup>c</sup> ± 0.06          |
| 10 (MTS1) | 55.30 <sup>cd</sup> ± 0.19 | 61.01 <sup>cd</sup> ± 0.34 | 65.83 <sup>bc</sup> ± 0.23  | 2.13 <sup>c</sup> ± 0.12          |
| 5 (MTS2)  | 54.49 <sup>d</sup> ± 0.07  | 60.92 <sup>d</sup> ± 0.06  | 67.46 <sup>ab</sup> ± 0.35  | 3.48 <sup>c</sup> ± 0.01          |
| 10 (MTS2) | 55.91 <sup>bc</sup> ± 0.34 | 60.48 <sup>e</sup> ± 0.03  | 64.23 <sup>c</sup> ± 0.05   | 1.49 <sup>c</sup> ± 0.04          |
| 5 (MBS)   | 56.79 <sup>b</sup> ± 0.01  | 64.97 <sup>a</sup> ± 0.01  | 69.25 <sup>a</sup> ± 0.08   | 8.93 <sup>ab</sup> ± 0.01         |
| 10 (MBS)  | 59.79 <sup>a</sup> ± 0.01  | 65.26 <sup>a</sup> ± 0.15  | 69.78 <sup>a</sup> ± 0.25   | 9.70 <sup>a</sup> ± 0.01          |

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ( $p < 0,05$ ).

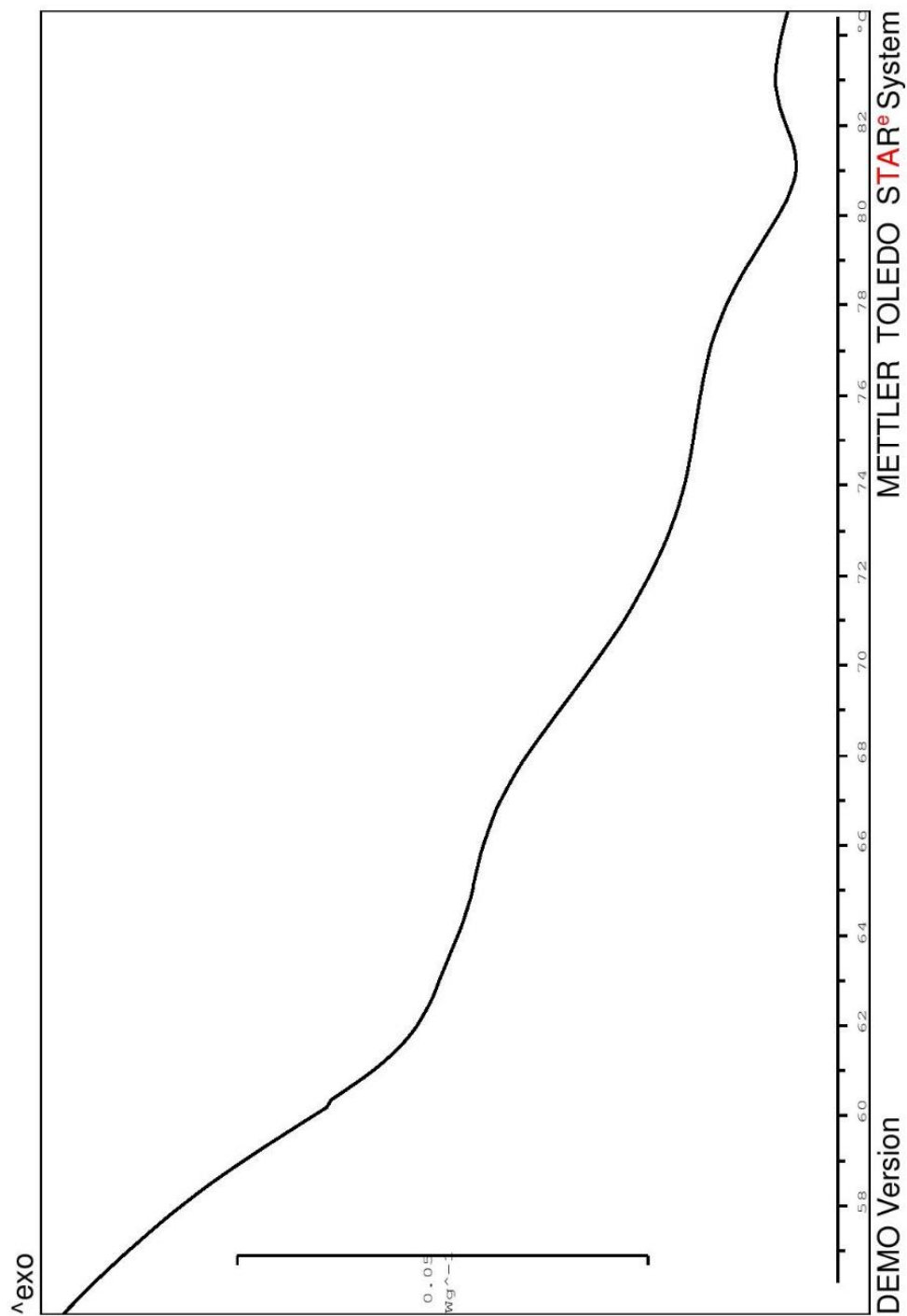
**Tablica 5** Temperature denaturacije ( $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_e$ ) i entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) aktina uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima modificiranih škrobova (MTS1, MTS2 i MBS) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri  $-30^\circ\text{C}$

| $w$ (%)   | $T_o$ ( $^\circ\text{C}$ ) | $T_p$ ( $^\circ\text{C}$ ) | $T_e$ ( $^\circ\text{C}$ ) | $\Delta H_a$ ( $\text{J g}^{-1}$ ) |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 0         | $74.69\text{c} \pm 0.66$   | $79.80\text{c} \pm 0.34$   | $82.57\text{ab} \pm 0.21$  | $2.21\text{a} \pm 0.05$            |
| 5 (MTS1)  | $77.69\text{a} \pm 0.06$   | $80.31\text{ab} \pm 0.07$  | $82.42\text{b} \pm 0.01$   | $0.53\text{cd} \pm 0.12$           |
| 10 (MTS1) | $78.06\text{a} \pm 0.40$   | $80.53\text{a} \pm 0.25$   | $82.38\text{b} \pm 0.21$   | $0.28\text{d} \pm 0.25$            |
| 5 (MTS2)  | $76.06\text{b} \pm 0.15$   | $79.94\text{bc} \pm 0.05$  | $82.42\text{b} \pm 0.10$   | $0.88\text{c} \pm 0.16$            |
| 10 (MTS2) | $77.34\text{a} \pm 0.20$   | $80.43\text{a} \pm 0.03$   | $82.50\text{b} \pm 0.06$   | $0.51\text{d} \pm 0.15$            |
| 5 (MBS)   | $75.02\text{c} \pm 0.75$   | $79.98\text{bc} \pm 0.10$  | $82.52\text{b} \pm 0.05$   | $1.54\text{b} \pm 0.16$            |
| 10 (MBS)  | $75.14\text{c} \pm 0.27$   | $80.01\text{bc} \pm 0.05$  | $82.82\text{a} \pm 0.03$   | $1.78\text{b} \pm 0.15$            |

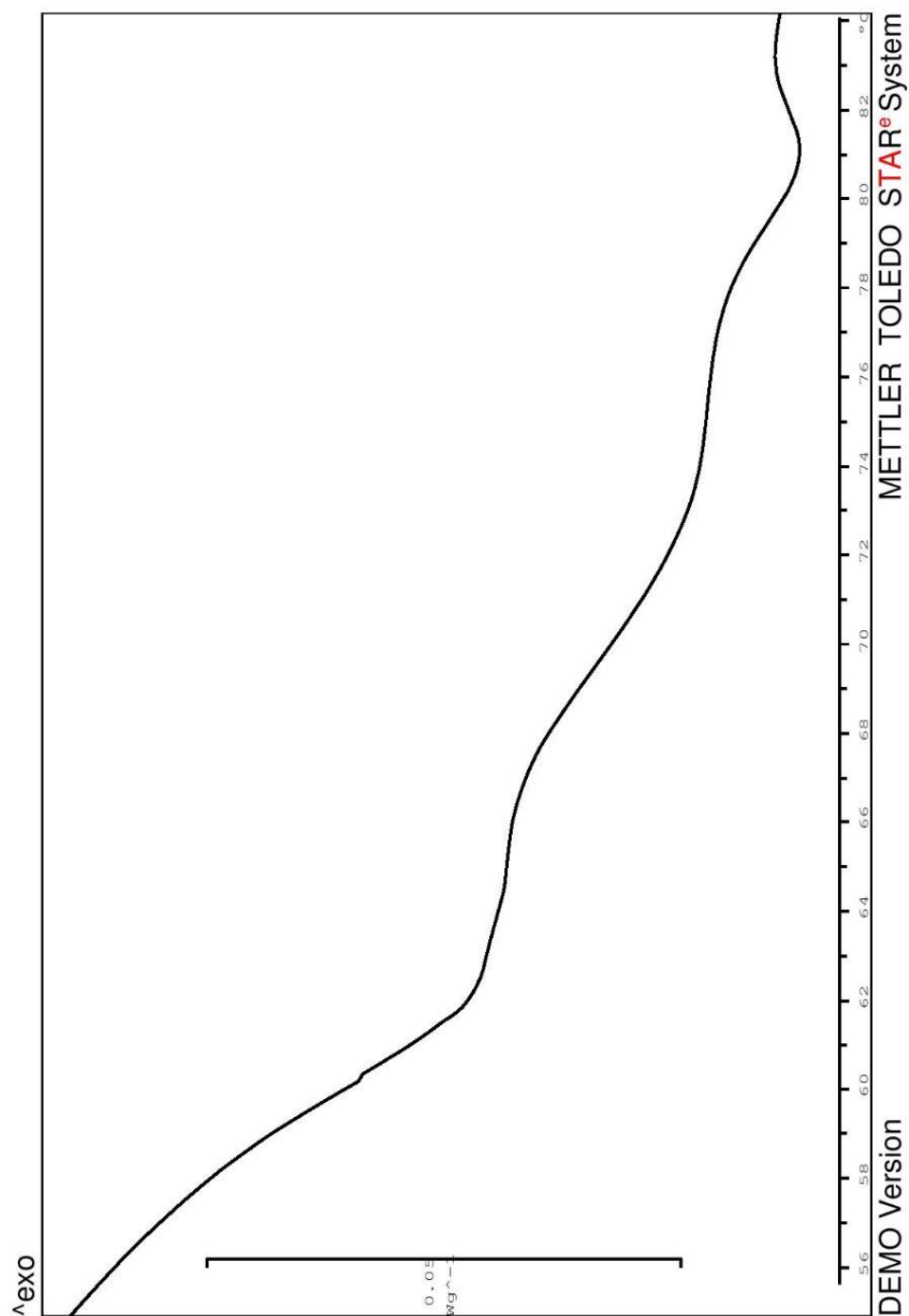
Prikazani rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ( $p < 0,05$ ).



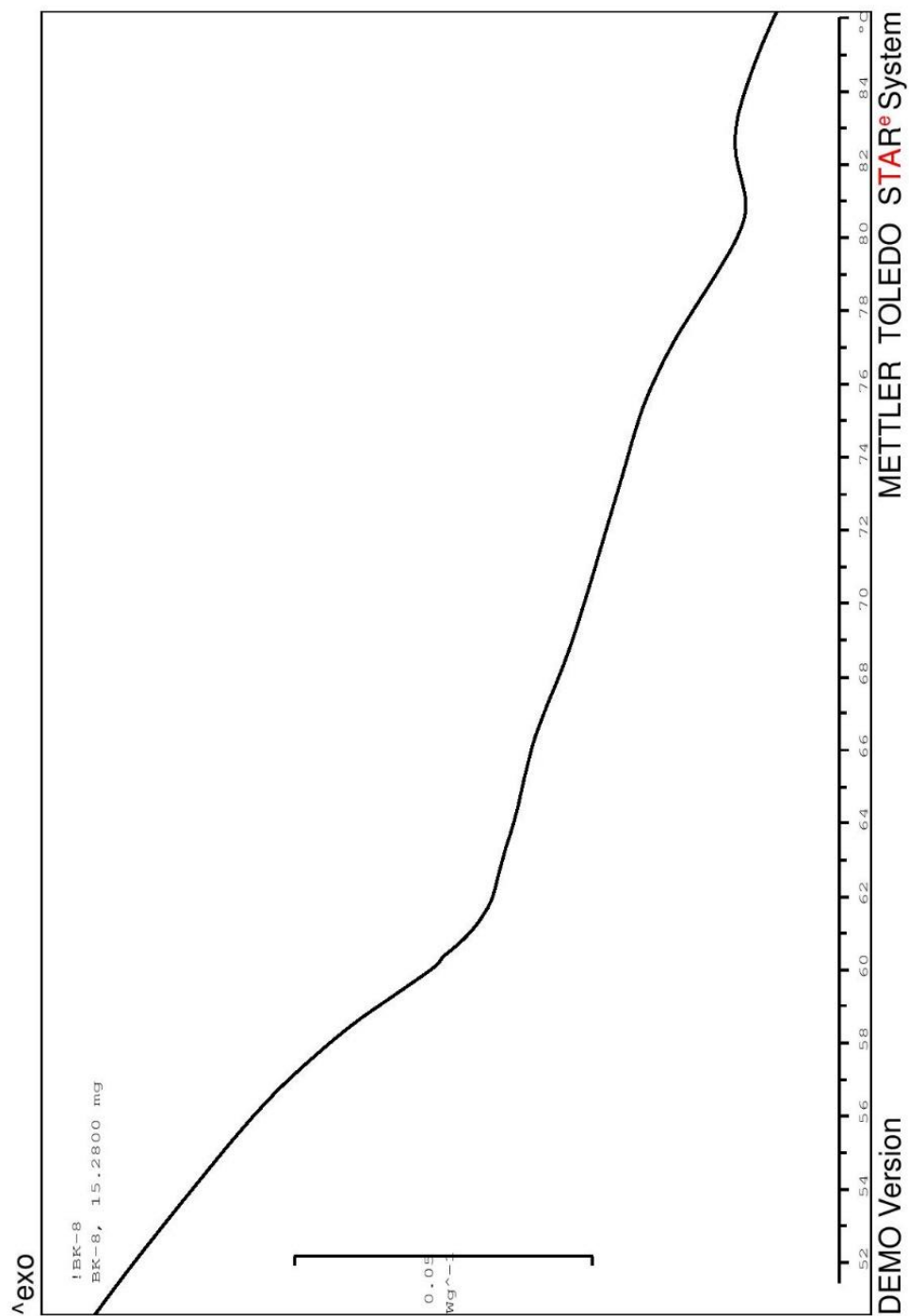
Slika 11 DMK termogram uzoraka pilećeg surimija nakon 30 dana skladištenja u zamrznutom stanju pri -30 °C



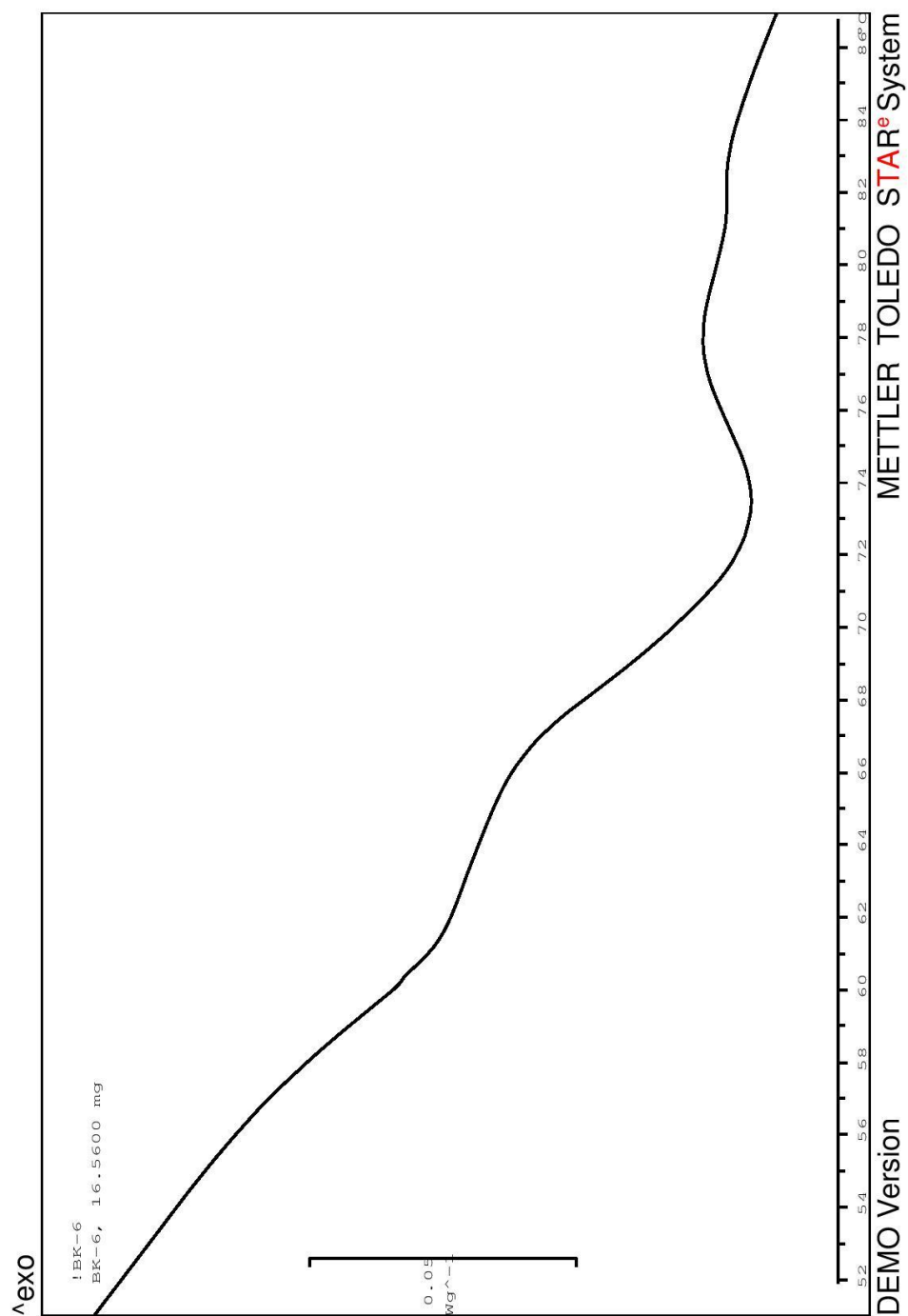
**Slika 12** DMK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke MTS1 ( $w = 5\%$ ) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$



**Slika 13** DMK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke MTS1 (w = 10 %) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri -30 °C

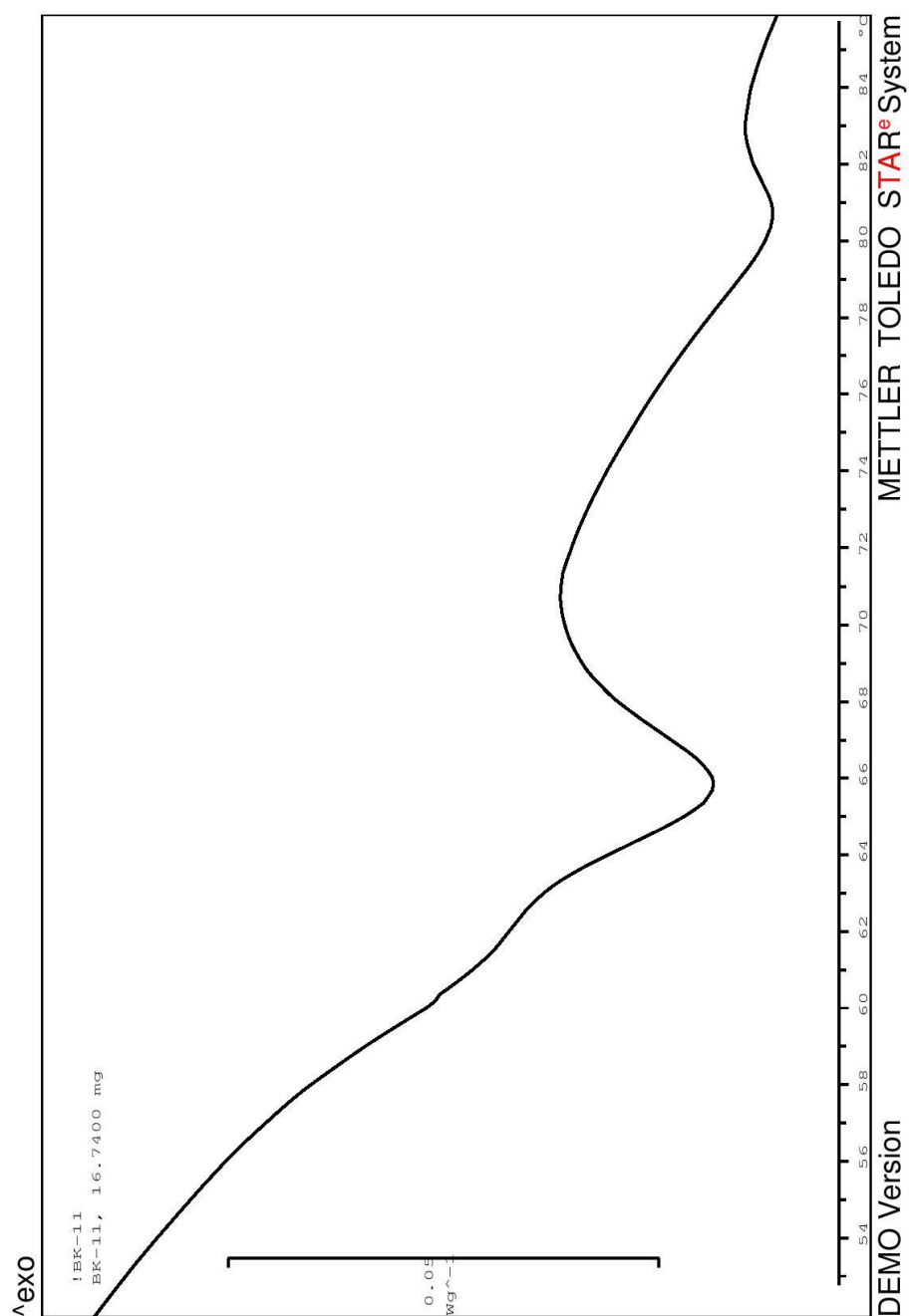


**Slika 14** DMK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke MTS2 ( $w = 5\%$ ) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

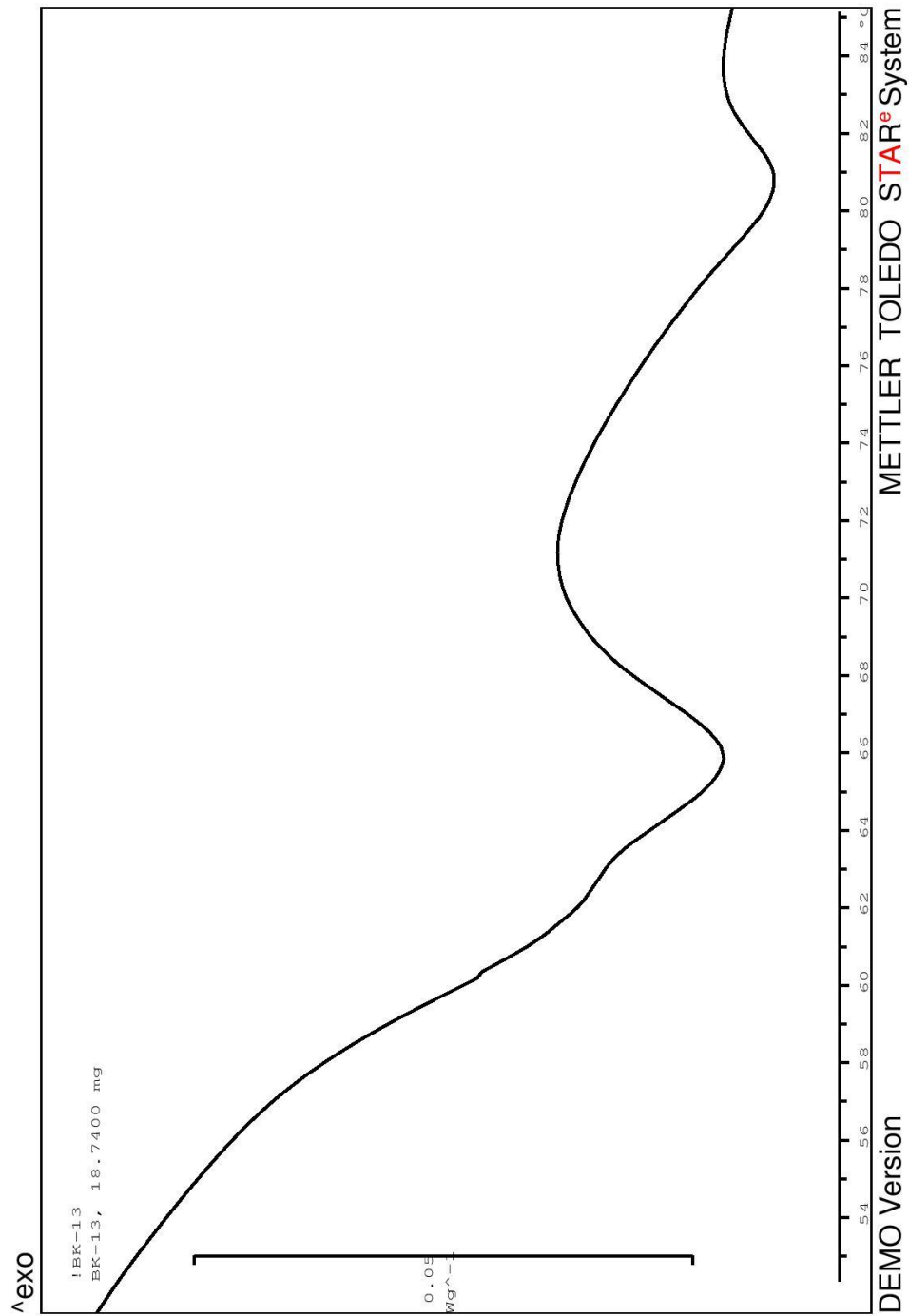


**Slika 12** DMK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz tapioke MTS2 (w = 10 %) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri -30 °C





**Slika 16** DMK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz ječma MBS (w = 5 %) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri -30 °C



**Slika 16** DMIK termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobom izoliranim iz ječma MBS ( $w = 10\%$ ) nakon 30 dana u zamrznutom stanju pri  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

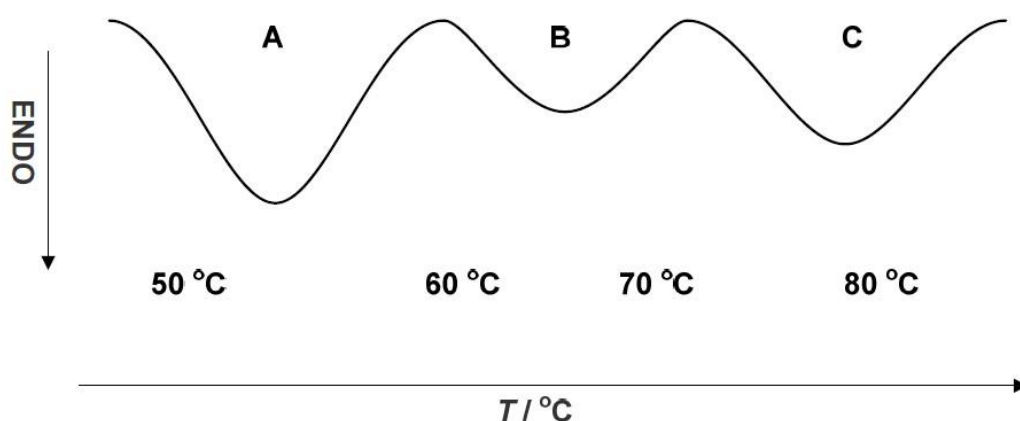
## 4.2. RASPRAVA

Osnovni kemijski sastav, pH i aktivitet vode uzoraka pilećeg surimija prikazani su u **Tablici 2**. Ispiranjem pilećeg mesa s destiliranom vodom uklanjaju se sarkoplazmatski i vezivnotkivni proteini, masti, slobodne masne kiseline, slobodne aminokiseline i ostali makromolekularni spojevi, te dolazi do povećanja koncentracije miofibrilarnih proteina, promjene ionske jakosti i pH vrijednosti miofibrilarnih proteina.

Rezultati mjerenja pH vrijednosti uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s različitim vrijednostima modificiranih škrobova ( $w = 5$  i  $10\%$ ) nakon 30 dana skladištenja pri  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prikazani su **Tablici 3**. Dodatak modificiranih škrobova nije imao značajniji utjecaj na pH vrijednost.

DMK mjerenja provedena su na sedam različitih uzoraka pilećeg surimija, s dodatkom modificiranih škrobova izoliranih iz tapioke i ječma u različitim masenim udjelima ( $w = 5$  i  $10\%$ ), u temperaturnom intervalu od  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  s brzinom zagrijavanja od  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Nakon pripreme uzoraka pilećeg surimija, dodani su im modificirani škrobovi u masenim udjelima od  $5$  i  $10\%$ . Uzorci su zatim zamrznuti brzim postupkom zamrzavanja u struji tekućeg dušika i uskladišteni mjesec dana na temperaturi od  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , te su provedena DMK mjerenja. DMK uređajem omogućena je brza i efikasna kontrola parametara koji definiraju način i uvjete mjerenja. Zbog velike osjetljivosti mjerenja i neposrednog (*on-line*) praćenja rezultata računalom, omogućeno je jednostavno prikupljanje i obrada podataka te grafička interpretacija rezultata.

Na **Slikama 11 – 16** prikazani su termogrami analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom različitih modificiranih škrobova u masenim udjelima od  $5$  i  $10\%$ . Vidljivo je da svaki termogram ima dva karakteristična pika. Sukladno standardnom DMK termogramu mišićnog tkiva (**Slika 17**) pikovi u termogramima (**Slike 11 – 16**) predstavljaju endotermne reakcije denaturacije aktina i miozina tijekom zagrijavanja.

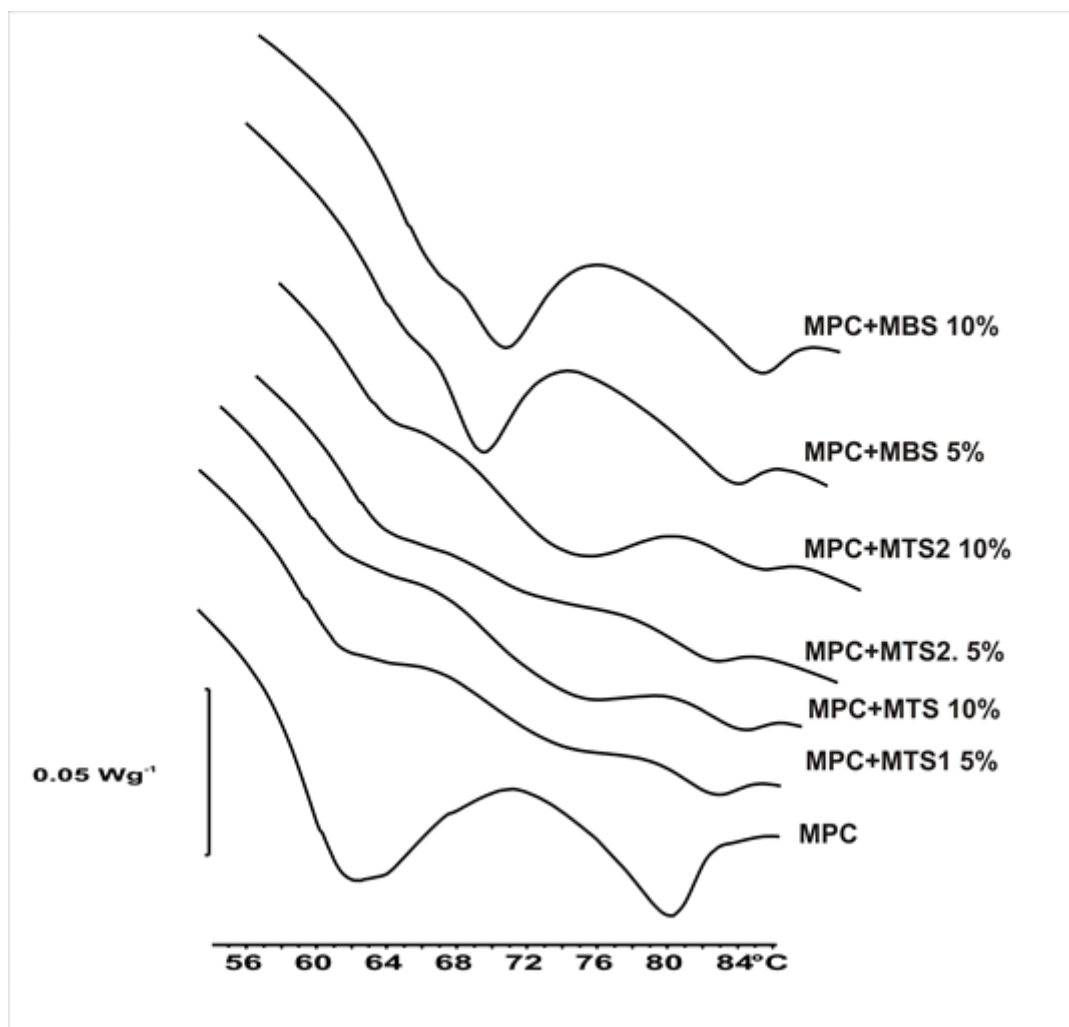


**Slika 17** Standardni DMK termogram mišićnog tkiva (A – entalpija denaturacije miozina, B – entalpija denaturacije sarkoplazmatskih proteina i kolagena, C – entalpija denaturacije aktina) (Mastanjević, 2010.)

Pomoću STAR<sup>e</sup> software-a određene su vrijednosti početnih temperatura denaturacije ( $T_o$ ), temperatura denaturacije ( $T_p$ ), završnih temperatura denaturacije ( $T_e$ ) i entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg surimija iz DMK termograma.  $T_o$  predstavlja početak vrha DMK krivulje,  $T_p$  vrh krivulje i  $T_e$  završetak vrha krivulje. Navedene temperature ekstrapolirane su iz DMK termograma i prikazane u **Tablicama 4 i 5**.

S obzirom na vrstu i maseni udio dodanog modificiranog škroba, temperature denaturacija miozina i aktina pilećeg surimija statistički značajno variraju ( $p < 0,05$ ) (**Tablice 4 i 5; Slika 18**). Dodatak modificiranih škrobova izoliranih iz tapioke (MTS1 i MTS2) u pileći surimi rezultirao je statistički značajnim ( $p < 0,05$ ) smanjenjem temperature denaturacije ( $T_p$ ) miozina i ( $T_p$ ) aktina uzoraka pilećeg surimija. Jedino je dodatak modificiranih škrobova izoliranih iz ječma (MBS) ( $w = 5$  i  $10\%$ ) uzrokovao statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje temperature denaturacije i miozina i aktina uzoraka pilećeg surimija od  $61,43\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $65,26\text{ }^{\circ}\text{C}$  i od  $79,80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $80,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Povećanje temperature denaturacije s povećanjem masenog udjela MBS-a može se protumačiti kao stabilizacija miozina i aktina miofibrilarnih proteina budući da su potrebne više temperature za denaturaciju navedenih miofibrilarnih proteina.

Pomoću STAR<sup>e</sup> software-a određene su vrijednosti promjene entalpije miozina ( $\Delta H_m$ ) i aktina ( $\Delta H_a$ ) metodom integracija površina vrha endotermnih krivulja. Vrijednosti  $\Delta H$  izražene su po gramu proteina (**Tablice 4 i 5**).



**Slika 18** DMK termogrami pilećeg surimija (MPC) s dodatkom modificiranih škrobova izoliranih iz tapioke (MTS1 i MTS2) i ječma (MBS), masenog udjela 5 i 10 %, nakon 30 dana skladištenja u zamrznutom stanju pri -30 °C

Vrijednosti entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) miozina i aktina uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s modificiranim škrobovima ( $w = 5$  i  $10$  %) nakon 30 dana skladištenja u zamrznutom stanju pri -30 °C prikazane su u **Tablicama 4 i 5**.

S obzirom na vrstu i maseni udio dodanih modificiranih škrobova, entalpije denaturacije ( $\Delta H$ ) značajno statistički značajnim ( $p < 0,05$ ) variraju. Entalpije denaturacije miozina ( $\Delta H_m$ ) uzoraka pilećeg surimija pomješanih s modificiranim škrobovima izoliranih iz tapioke (MTS1 i MTS2) pokazale su statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenjem s povećanjem masenog udjela navedenih škrobova.

Povećanjem masenog udjela modificiranog škroba iz ječma (MBS) u uzorcima pilećeg surimija povećavaju se statistički značajno ( $p < 0,05$ ) i entalpije denaturacije miozina i aktina ( $\Delta H_m, \Delta H_a$ ) (**Slike 11-16; 18**).

Kako su vrijednosti entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) izravno povezane s količinom nativnih proteina, više vrijednosti entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) dovode do zaključka da modificirani škrobovi izolirani iz ječma (MBS), sukladno mehanizmu krioprotekcije, ulaze u interakcije s miofibrilarnim proteinima pilećeg surimija, što rezultira povećanjem masenog udjela nesmrzljive vode, višim temperaturama denaturacije ( $T_p$ ) i većim vrijednostima entalpije miofibrilarnih proteina. Veći maseni udio vezane vode u uzorcima rezultira boljim očuvanjem miozina i aktina tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju, odnosno većom entalpijom denaturacije.



## **5. ZAKLJUČCI**



Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. DMK termogrami uzoraka pilećeg surimija s dodatkom različitih masenih udjela modificiranih škrobova izoliranih iz tapioke i ječma ( $w = 5$  i  $10\%$ ) sastojali su se od dva karakteristična pika koji, sukladno standardnom DMK dijagramu mišićnog tkiva, predstavljaju endotermne reakcije denaturacije miozina i aktina tijekom zagrijavanja.
2. Analizom varijance temperatura denaturacije ( $T_p$ ) miozina i aktina pokazano je da su temperature denaturacije ( $T_p$ ) miozina statistički značajno varirale ( $P < 0,05$ ) sa dodatkom modificiranih škrobova (MBS, MTS1 i MTS2) u masenim udjelima 5 i  $10\%$ . Jedino je dodatak modificiranog škroba izoliranog iz ječma (MBS) uzrokovao statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje vrijednosti temperatura denaturacije i miozina i aktina. Povećanje temperature denaturacije miozina i aktina dodatkom MBS-a ukazuje na mogućnost interakcija i stabilizacije miofibrilarnih proteina s modificiranim škrobom izoliranim iz ječma (MBS), budući da su bile potrebne više temperature za denaturaciju proteina.
3. Entalpije denaturacije miozina ( $\Delta H_m$ ) uzoraka pilećeg mesa s dodatkom MTS1 i MTS2 ( $w = 5$  i  $10\%$ ) pokazuju statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje entalpije denaturacije miozina.
4. Povećanjem masenog udjela modificiranog škroba iz ječma (MBS) u uzorcima pilećeg surimija povećavaju se i entalpije denaturacije miozina i aktina ( $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_a$ ) što upućuje na zaključak da modificirani škrobovi izolirani iz ječma (MBS), sukladno mehanizmu krioprotekcije, ulaze u interakcije s miofibrilarnim proteinima pilećeg surimija. Tim interakcijama dolazi do povećanja masenog udjela nesmrzljive vode, viših temperatura denaturacije ( $T_p$ ) i većih vrijednosti entalpije denaturacije miofibrilarnih proteina. Veći maseni udio vezane vode u uzorcima rezultira boljim očuvanjem miozina i aktina tijekom zamrzavanja i skladištenja u zamrznutom stanju, odnosno većom entalpijom denaturacije.

## **6. LITERATURA**

- Babić J, Šubarić D, Ačkar Đ, Jozinović A, Miličević B, Pajin B, Aličić D: Primjena dodataka na bazi škroba u mesnoj industriji. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, 3:209-228, 2013.
- Babić J, Šubarić D, Nedić Tiban N, Kopjar M: Acetylation and characterization of corn starch. *J. Food Sci. Technology*, 46:423-426, 2009.
- Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodatka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2007.
- Babić J: Škrob. U *Interna skripta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2011.
- Belibagi KB, Speers RA, Paulson AT: Thermophysical properties of silver hake and mackerel surimi at cooking temperatures. *J. Food Eng.* 60:493-448, 2003.
- Cheow CS, Yu SY: Effect of fish protein, salt, sugar and monosodium glutamate on the gelatonization of starch in fish-starch mixtures. *J. Food Process Pres.*, 21:161-177, 1997.
- Eliasson AC: Starch in Food. Woodhead Publishing Ltd., Engleska, 2004.
- Farkas J, MohacsiFarkas C: Application of differential scanning calorimetry in food research and food quality assurance. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 47:1787-1803, 1996.
- Findlay CJ, Barbut S: Thermal Analysis of Food Proteins in Relation to Processing Data. Page 92-125 in: *Thermal Analysis of Food*, V. R. Harwalkar and C. -Y Ma (ed) Barking, UK, 1990.
- Gunaratne A: Physical and chemical modification of some cereal, tuber and root starches and the role of  $\beta$ -cyclodextrin as a starch modifying agent. *Doktorski rad*. The University of Hong Kong, 2006.
- Herrera JR, Mackie IM: Cryoprotection of frozen stored actomyosin or formed rainbow trout by dome sugars and polyols. *Food Chemistry*, 84:91-97, 2004.
- Jobling S: Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:210-218, 2004.

Jovanovac B: Krioprotektorsko djelovanje trehaloze na miofibrilarne proteine pilećeg mesa. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Karlson P: Biokemija (preveli Mildner P i Mildner B). Školska knjiga, Zagreb, 1998.

Kovačević D: Kemija i tehnologija mesa i ribe. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2001.

Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus, Zagreb, 2003.

MacDonald GA, Lanier TC: Carbohydrates As Cryoprotectants for Meats and Surimi Food. *Food Tech-Chicago*, 46:150, 1991.

Mastanjević k: Određivanje krioptotektorske sjelotvornosti trehaloze na različite uzorke mesa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2010.

Nedić Tiban N: Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije za utvrđivanje patvorenja meda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2005.

Pérez-Chabela ML, Mateo-Oyagüe J: Frozen meat: Quality and shelf life. U *Handbook of Frozen Foods*, Hui YH, Cornillon P, Lageretta IG, Lim MH, Murell KD, Nip WK. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 201-203,204, 2004.

Rabelić S: Miofibrili. U *Osnove tehnologije mesa*, 23-35. Školska knjiga, Zagreb, 1978.

Stangierski J, Rezler R, Baranowska HM, Poliszko S: Effect of Enzymatic Modification on Chicken Surimi. *Czech Journal Food Science* 30:404-411, 2012.

Šubarić D, Babić J, Ačkar Đ: Modificiranje škroba radi proširenja primjene. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, 1:247-258, 2012.

Šubarić D, Babić J, Ačkar Đ: Tehnologija škroba. U *Interna skripta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2011.

Tarté R: Ingredients in Meat Products, Properties, Functionality and Applications. Springer Science + Buisness Media, LLC, New York, SAD, 2009.

- Tornaniak A, Tyszkiewicz I, Komosa J: Cryoprotectants for frozen red meats. *Meat Science*, 50:365-371, 1998.
- Tornberg E: Effect of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70:493-508, 2005.
- Van Beyrum GMA, Roles JA: Starch Conversion Technology. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 2005.
- Walter RH: Polysaccharide association structures in food. Marcel Dekker, Inc. New York, SAD, 1998.
- Wurtzburg, O.B.: Preparation of starch derivatives, US Patent Nr 2,935,510, 1960.
- Yang TS, Froning GW: Changes in Myofibrillar Protein and Collagen Content of Mechanically Deboned Chicken Meat Due to Washing and Screening. *Poultry Sci.* 71:1221-1227, 1992.
- [https://www.google.com/search?q=dsc+mettler+toledo+882e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwidsNymm5bgAhUix4UKHQDiD5IQ\\_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgrc=SiUqC1U1VBdgDM](https://www.google.com/search?q=dsc+mettler+toledo+882e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwidsNymm5bgAhUix4UKHQDiD5IQ_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgrc=SiUqC1U1VBdgDM): 17. veljače 2018.